

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**Zonas de la superficie del Dimero de AlfaBeta-Tubulina y de
los microtúbulos: proteólisis limitada y análisis de secuencias
múltiples**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

José María Pereda Vega

Director

José Manuel Andreu Morales

Madrid 2005

ISBN: 978-84-8466-979-1

© José María Pereda Vega, 1995

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Presidente: Sr. Dr. Emilio Pérez

Vocal: Sr. Dr. Ruiz Lera

Vocal: Sr. Dr. Francisco Blanco

Vocal: Sr. Dr. Valdemar Hernández

Vocal: Sr. Dr. Valencia Moreno

Secretario: Sr. Dr. Marino Houdryll

**ZONAS DE LA SUPERFICIE DEL DÍMERO DE $\alpha\beta$ -
TUBULINA Y DE LOS MICROTÚBULOS: PROTEOLISIS
LIMITADA Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS MÚLTIPLES.**

TESIS DOCTORAL

JOSÉ MARÍA DE PEREDA VEGA

Madrid, 1995

Dirigida por el Dr. José Manuel Andreu Morales,
Profesor de Investigación del
Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C., Madrid

"It can be said with complete confidence that any scientist of any age who wants to make important discoveries must study important problems. Dull or piffling problems yield dull or piffling answers. It is not enough that a problem should be *interesting* - almost any problem is interesting if it is studied in sufficient depth."

Peter Medawar "Advice for a young scientist"

Indice

AGRADECIMIENTOS	I
INDICE	II
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	IX
 INTRODUCCIÓN	 1
 1. El citoesqueleto.	 2
2. Los microtúbulos: estructura.	2
3. La tubulina.	6
3.1. Secuencia aminoacídica.	7
3.2. Estructura secundaria.	7
3.3. Estructura terciaria.	8
3.3.1. Proteólisis limitada de tubulina.	8
3.3.2. Anticuerpos de especificidad dirigida frente a tubulina	9
3.4. Genética de tubulinas. Isotipos y regulación de la expresión.	11
3.4.1. Genes de tubulinas en vertebrados.	11
3.4.1.1. α -tubulina.	11
3.4.1.2. β -tubulina.	12
3.4.2. Significación funcional de los isotipos de tubulina.	14
3.4.2.1. Ejemplos de redundancia funcional de isotipos.	14
3.4.2.2. Ejemplo de función especializada de isotipos.	14
3.4.3. Regulación de la expresión de tubulina.	15
3.5. Modificaciones post-traduccionales.	16
3.5.1. Acetilación.	16
3.5.2. Tirosinación, detirosinación y tubulina no tirosinable.	17
3.5.3. Fosforilación.	17
3.5.4. Poliglutamitación.	18
3.5.5. Poliglicilación.	19
3.6. El sitio de unión de nucleótido.	20
4. Proteínas asociadas a microtúbulos.	26
5. Motores microtubulares.	27
6. La proteína de división celular bacteriana FtsZ.	27
6.1. Unión e hidrólisis de nucleótido.	28
6.2. Polímeros de FtsZ <i>in vitro</i> .	29

6.3. Homología de secuencia entre FtsZ y tubulina.	30
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Materiales.	36
1.1. Ligandos y productos químicos.	36
1.2. Tubulina: purificación y cuantificación.	36
1.3. Proteasas.	37
1.4. Inhibidores de proteasas.	37
2. Métodos.	40
2.1. Polimerización de microtúbulos de taxol y proteólisis limitada.	40
2.2. Polimerización de tubulina en hojas inducidas por Zn ²⁺ y proteólisis limitada.	40
2.3. Monitorización de la polimerización: turbidez y medida de la concentración crítica.	41
2.4. Ultracentrifugación analítica: velocidad de sedimentación.	42
2.5. Microscopía electrónica.	42
2.6. Electroforesis.	43
2.7. Determinación del peso molecular aparente.	43
2.8. Transferencia.	44
2.9. Anticuerpos.	47
2.9.1. Anticuerpos monoclonales.	47
2.9.2. Anticuerpos monoespecíficos.	48
2.9.3. Producción de anticuerpos monoespecíficos.	48
2.10.. Inmunodetección.	52
2.11. Clasificación y nomenclatura de los fragmentos de tubulina.	52
2.12. Secuenciación.	53
2.13. Elucidación de los mapas peptídicos generados mediante proteólisis limitada.	53
2.14. Dicroísmo circular.	54
2.15. Determinación de la concentración de magnesio.	54
2.16. Estudios de secuencia y predicción de estructura.	55
2.16.1. Alineamiento múltiple de secuencias.	55
2.16.2. Método PHD de predicción de estructura secundaria.	55
2.16.3. Método PHDacc de predicción de accesibilidad del solvente.	59
2.16.4. Determinación del momento hidrofóbico.	61

RESULTADOS	62
1. Proteolisis limitada comparada de tubulina dimérica y microtúbulos inducidos por taxol.	63
1.1. Caracterización de los estados estudiados por proteolisis limitada.	63
1.1.1. Tubulina no polimerizada.	63
1.1.2. Ensamblaje de microtúbulos inducidos por taxol.	67
1.2. Proteolisis limitada con tripsina.	71
1.3. Proteolisis limitada con quimotripsina.	75
1.4. Proteolisis limitada con elastasa.	79
1.5. Proteolisis limitada con clostripaina.	82
1.6. Proteolisis limitada con endoproteinasa Lys-C.	87
1.7. Proteolisis limitada con termolisina.	93
1.8. Proteolisis limitada con protensa V8.	98
1.9. Proteolisis limitada con papaína.	103
1.10. Proteolisis limitada con subtilisina.	108
1.11. Proteolisis limitada con proteinasa K.	114
1.12. Proteolisis limitada con endoproteinasa Asp-N.	119
1.13. Proteolisis limitada con bromelaina.	123
2. Proteolisis limitada comparada de tubulina dimérica y hojas de tubulina inducidas por Zn^{2+} .	128
2.1. Caracterización de las hojas de tubulina inducidas por Zn^{2+} .	128
2.2. Cambio conformacional asociado a la unión de Zn^{2+} .	132
2.3. Proteolisis limitada con tripsina.	138
2.4. Proteolisis limitada con quimotripsina.	142
2.5. Proteolisis limitada con elastasa.	146
2.6. Proteolisis limitada con endoproteinasa Lys-C.	150
2.7. Proteolisis limitada con subtilisina.	154
2.8. Proteolisis limitada con proteinasa K.	159
2.9. Proteolisis limitada con endoproteinasa Asp-N.	163
3. Predicción de estructura de tubulinas.	166
3.1. Predicción de estructura de α -tubulina.	166
3.2. Predicción de estructura de β -tubulina.	174
4. Predicción de estructura de FtsZ.	185
5. Comparación de la estructura secundaria de tubulina y FtsZ.	188
DISCUSION	195

1. La proteólisis limitada facilita información estructural.	196
1.1. Enlaces peptídicos hidrolizados.	196
1.2. Interpretación de los puntos potenciales de proteólisis limitada que no son digeridos.	197
2. Regiones definidas sensibles a proteólisis limitada en α y β -tubulina.	198
3. Proteólisis limitada de microtúbulos inducidos por taxol.	210
3.1. Consecuencias estructurales del ensamblaje.	210
3.2. Zonas sensibles al ataque proteolítico en microtúbulos: topología de la superficie externa de los microtúbulos.	216
4. Proteólisis limitada de tubulina en presencia de Zn^{2+} .	220
4.1. Cambio conformacional inducido por Zn^{2+} .	220
4.2. Proteólisis limitada de tubulina- Zn^{2+} -glicerol no polimerizada.	224
4.3. Efecto de la polimerización en hojas sobre la accesibilidad a proteasas.	227
4.4. Proteólisis limitada de hojas inducidas por Zn^{2+} : comparación con los microtúbulos inducidos por taxol.	229
5. Modelo de estructura de las regiones α (103-172) y β (93-170) de tubulina y (66-139) de FtsZ.	231
CONCLUSIONES	236
BIBLIOGRAFIA	239

Abreviaturas

ATP	Adenosina trifosfato.
BSA	Albúmina de suero bovino.
DMSO	Sulfóxido de dimetilo.
DTT	1,4-ditiotreitol.
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético (sal disódica).
ELISA	Enzimoimmunoensayo.
GDP	Guanosina difosfato.
GTP	Guanosina trifosfato.
h	Horas.
K_d	constante de disociación.
KLH	Hemocianina.
MBS	m-maleimido-benzoil N-hidroxisuccinimida ester.
min	minutos.
μ_H	momento hidrofóbico.
NaPi	hidrógeno fosfato y dehidrogéno fosfato.
PBS	Tampón fosfato salino.
PMap	Peso molecular aparente.
PMcor	Peso molecular corregido.
PMSF	Fluoruro de metil fenil-sulfonio.
p/p	Relación peso peso.
p/v	Relación peso volumen
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato sódico.

TBS	Tampón Tris salino.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina.
$[\Theta]$	elipticidad molar por residuo medio.

Resumen

.

Proteolisis limitada de tubulina nativa. Se ha realizado sistemáticamente la proteolisis limitada del heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina nativa con 12 proteasas para localizar zonas accesibles de la superficie de esta proteína. La identificación de los fragmentos se ha realizado inicialmente mediante inmunodetección con un panel de 9 anticuerpos, específicos de otros tantos epítopos distribuidos a lo largo de la secuencia de ambas cadenas (Andreu y de Pareda, 1993). La posterior microsecuenciación del extremo amino ha permitido la localización precisa de 18 puntos de digestión. La digestión controlada de las tubulinas ocurre preferentemente en 4 regiones de la secuencia (denominadas A, B, C y D). Las nuevas regiones A sensibles a proteolisis se han localizado en α -tubulina en las proximidades de la Lys40, y en torno a las posiciones 50-100 en β -tubulina. Las otras 3 zonas (B, C y D) corresponden, con cambios menores, a las zonas definidas con anterioridad (de la Viña, 1988). La zona B se extiende entre las posiciones 160-190. La región C es más extensa e incluye puntos de corte entre las posiciones 275 a 360; los puntos de esta zona localizados exactamente se concentran en 2 subzonas precisas: C_A se extiende aproximadamente en las secuencias α (280-295) y β (278-285); y C_B se extiende en torno a las posiciones α 339 y β 353. La región D está en el extremo carboxilo y comprende aproximadamente los últimos 20 y 50 residuos de α - y β -tubulina respectivamente.

Proteolisis limitada comparada de tubulina heterodimérica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol. La proteolisis limitada comparada de tubulina heterodimérica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol facilita información sobre la orientación espacial de los residuos accesibles. La zona A es accesible en el polímero, de acuerdo con la acetilación en la Lys40 de la α -tubulina ensamblada [Le Dizet, 1987 #]. La zona B, secuencialmente próxima a la zona rica en Gly característica de tubulinas, también es accesible en los microtúbulos. En las zonas C los puntos de ataque proteolítico que se protegen en la polimerización se localizan principalmente en torno a la posición 280 (subzonas C_A) de α - y β -tubulina y entre las posiciones 339-340 de α -tubulina. La región D se protege parcialmente en α -tubulina; en β -tubulina se observa un aumento de la digestión de ciertas proteasas en las posiciones más internas, ya descritas en el heterodímero.

Estructura y proteolisis limitada comparada de tubulina-Zn²⁺ no ensamblada y polimerizada en hojas inducidas por Zn²⁺-glicerol. Se ha observado un cambio en el espectro de dicroísmo circular de la tubulina dimérica en tampón 100 mM MES, 3.4 mM glicerol, 0.1 mM MgCl₂, 0.3 mM ZnCl₂, 0.1 mM GTP pH 6.5, respecto al estado de referencia en tampón fosfato neutro. El patrón de proteolisis limitada de $\alpha\beta$ -tubulina, no ensamblada, en presencia de Zn²⁺ es muy similar al descrito (ver antes). En la forma polimerizada en hojas inducidas por Zn²⁺ se protegen puntos de corte de las zonas C que estaban expuestos en los microtúbulos. Probablemente se debe a la interacción distinta entre los protofilamentos de estos dos tipos de estructuras, que permiten un mayor empaquetamiento en las hojas siendo mayor la superficie ocluida.

Predicción de estructura de tubulinas y FisZ. Se ha aborado el estudio de la estructura de las tubulinas mediante la combinación de los datos experimentales, obtenidos en este trabajo y descritos en la literatura, con métodos de predicción de estructura basados en el análisis de alineamientos de múltiples secuencias. Se ha observado que los puntos de ataque proteolítico se localizan en su mayoría en bucles. Se ha propuesto un modelo de estructura supersecundaria de las regiones α (103-172) y β (93-170) de tubulina, que incluyen 2 zonas de interacción con los residuos de fosfato del nucleotido. La proteína bacteriana FisZ es una GTPasa y presenta homología de secuencia parcial con tubulinas. Se ha observado por primera vez que también existe homología a nivel de estructura secundaria; el mayor segmento con homología estructural es una región de ca. 80 residuos que ha permitido proponer un modelo de estructura supersecundaria para la región 66-139.

Los resultados de proteolisis limitada introducen importantes constricciones estructurales, que serán una prueba valiosa para cualquier modelo de estructura del dímero de tubulina a alta resolución y su orientación en microtúbulos y hojas. Su combinación con métodos modernos de predicción de estructura posibilitan el desarrollo de modelos estructurales.

Introducción

1. El citoesqueleto.
2. Los microtúbulos: estructura.
3. La tubulina.
 - 3.1. Secuencia aminoacídica.
 - 3.2. Estructura secundaria.
 - 3.3. Estructura terciaria.
 - 3.3.1. Proteólisis limitada de tubulina.
 - 3.3.2. Anticuerpos monoespecíficos.
 - 3.4. Genética de tubulinas. Isotipos y regulación de la expresión.
 - 3.4.1. Genes de tubulinas en vertebrados.
 - 3.4.2. Significación funcional de los isotipos de tubulina.
 - 3.4.3. Regulación de la expresión de tubulina.
 - 3.5. Modificaciones post-traduccionales.
 - 3.5.1. Acetilación.
 - 3.5.2. Tirosinación, detirosinación y tubulina no tirosinable.
 - 3.5.3. Fosforilación.
 - 3.5.4. Poliglutamilación.
 - 3.5.5. Poliglicilación.
 - 3.6. El sitio de unión de nucleótido.
4. Proteínas asociadas a microtúbulos.
5. Motores microtubulares.
6. La proteína de división celular bacteriana FtsZ.
 - 6.1. Unión e hidrólisis de nucleótido.
 - 6.2. Polímeros de FtsZ *in vitro*.
 - 6.3. Homología de secuencia entre FtsZ y tubulina.

1. EL CITOESQUELETO.

El término citoesqueleto fue introducido hace más de dos siglos por J.T. Needham, para describir estructuras exoesquelóticas en protozoos. En 1879 W. Flemming describió por primera vez los estadios de la mitosis e introdujo el concepto de citoesqueleto como una estructura endoesquelética fibrilar la cual confería elasticidad al citoplasma (Heidenhain 1899; Franz 1939).

El citoesqueleto se puede definir como el material celular que permanece tras una extracción con un detergente no iónico (Schliwa 1986). Está integrado por tres tipos de fibras de naturaleza proteica: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Se encuentra en el citoplasma de las células eucarióticas y es responsable de la forma celular, la organización espacial interna, motilidad, movimientos de cilios y flagelos, movimientos de cromosomas durante la mitosis y de propiedades físicas como la elasticidad. Estas características celulares son debidas al alto dinamismo de que constan las estructuras citoesqueléticas capaces de polimerizar y despolimerizar a partir de sus subunidades proteicas (Bershadsky y Vasiliev 1988; Darnell, Lodish et al. 1990).

2. LOS MICROTÚBULOS: ESTRUCTURA.

Los microtúbulos celulares típicos son polímeros cilíndricos no covalentes de unos 25 nm de diámetro, compuestos de tubulina y proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). En las células en división los microtúbulos son los componentes mayoritarios del huso mitótico, que es esencial para la segregación de los cromosomas (Mitchinson y Sawin 1990). La estructura microtubular es dinámica, como ya se pudo ver por la rápida respuesta del huso mitótico a las perturbaciones del equilibrio tubulina-microtúbulos (Inoue y Sato 1967), en las oscilaciones continuas de los cromosomas (Bajer 1982), y en el movimiento de pequeñas partículas atrapadas en el huso mitótico (Bajer y Mole-Bajer 1972). Debido a la implicación del huso mitótico en la división celular, los microtúbulos, componentes mayoritarios de éste, son el blanco de las drogas antimitóticas (Hamel 1992).

El ensamblaje de microtúbulos *in vivo* se produce inducido por la presencia de las

MAPs, estas proteínas promueven el ensamblaje de la tubulina *in vitro* y durante algún tiempo se pensó que eran imprescindibles para éste. La tubulina purificada contiene toda la información necesaria para producir microtúbulos, pero para que esta reacción se lleve a cabo son necesarias concentraciones extraordinariamente elevadas de proteína (Lee y Timasheff 1975; Lee y Timasheff 1977), sin embargo puede realizarse en presencia de promotores inespecíficos de la polimerización como el glicerol o el DMSO (Lee y Timasheff 1975; Himes, Burton et al. 1977), o de promotores específicos como el taxol y derivados (Schiff y Horowitz 1981; Howard y Timasheff 1988).

Los microtúbulos son esencialmente polímeros helicoidales de heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina que contienen 13 protofilamentos longitudinales (Tilney, Brian et al. 1973). El primer estudio de la disposición de las subunidades de tubulina en los microtúbulos flagelares se realizó en 1966 (Grimstone y Klug 1966), en el que se concluyó que la red de superficie de los microtúbulos era helicoidal con un período de 4.0 nm a lo largo del eje del microtúbulo. El estudio clásico de estructura de los microtúbulos de Amos y Klug realizado mediante reconstrucción de imágenes de microscopía electrónica de microtúbulos flagelares (Amos y Klug 1974), concluyó que los dímeros de tubulina están alineados cabeza-cola a lo largo del eje del microtúbulo formando contactos longitudinales $-\alpha\beta-\alpha\beta-$, y formando contactos laterales bien $\alpha\beta-\beta\alpha$ si corresponden a la estructura flagelar tipo A o $\alpha\alpha-\beta\beta$ si corresponde a la estructura tipo B, según puede observarse en la figura 1. La estructura de su superficie consiste en una triple hélice con 12 nm de paso y 13 protofilamentos. A la resolución de las medidas, el dímero de tubulina tiene una longitud de 8.0 nm, y está orientado a lo largo del eje del microtúbulo. Cada uno de los monómeros, globulares a la resolución de 4.0 nm del trabajo, tiene 4.0 nm de diámetro.

Se obtuvo un modelo a mayor resolución, hasta 2.5 nm, a partir de estudios de difracción de rayos-X de fibras de microtúbulos orientadas (Mandelkow, Thomas et al. 1977). Este estudio llevó a la construcción de un modelo más detallado que el anterior, en el cual se puede ver que el monómero tiene una forma elipsoidal.

El modelo de los microtúbulos a una mayor resolución que existe actualmente fue obtenido también a partir de datos de difracción de rayos-X de fibras de microtúbulos hidratados (Beese, Stubbs et al. 1987). Este estudio alcanza una resolución de 1.8 nm, y es

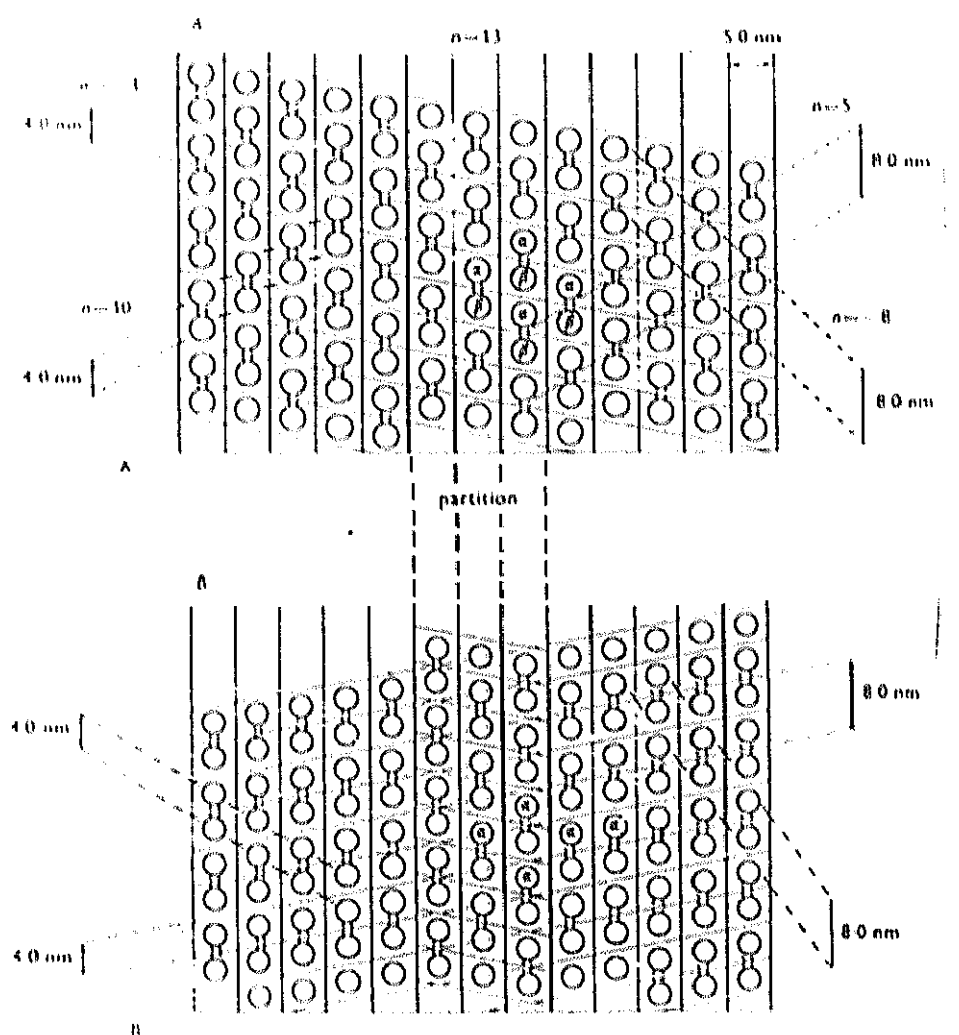


Figura 1. Red de superficie desenrollada de los microtúbulos flagelares. (a) estructura flagelar A y (b) estructura flagelar B. (Amos y Klug, 1974).

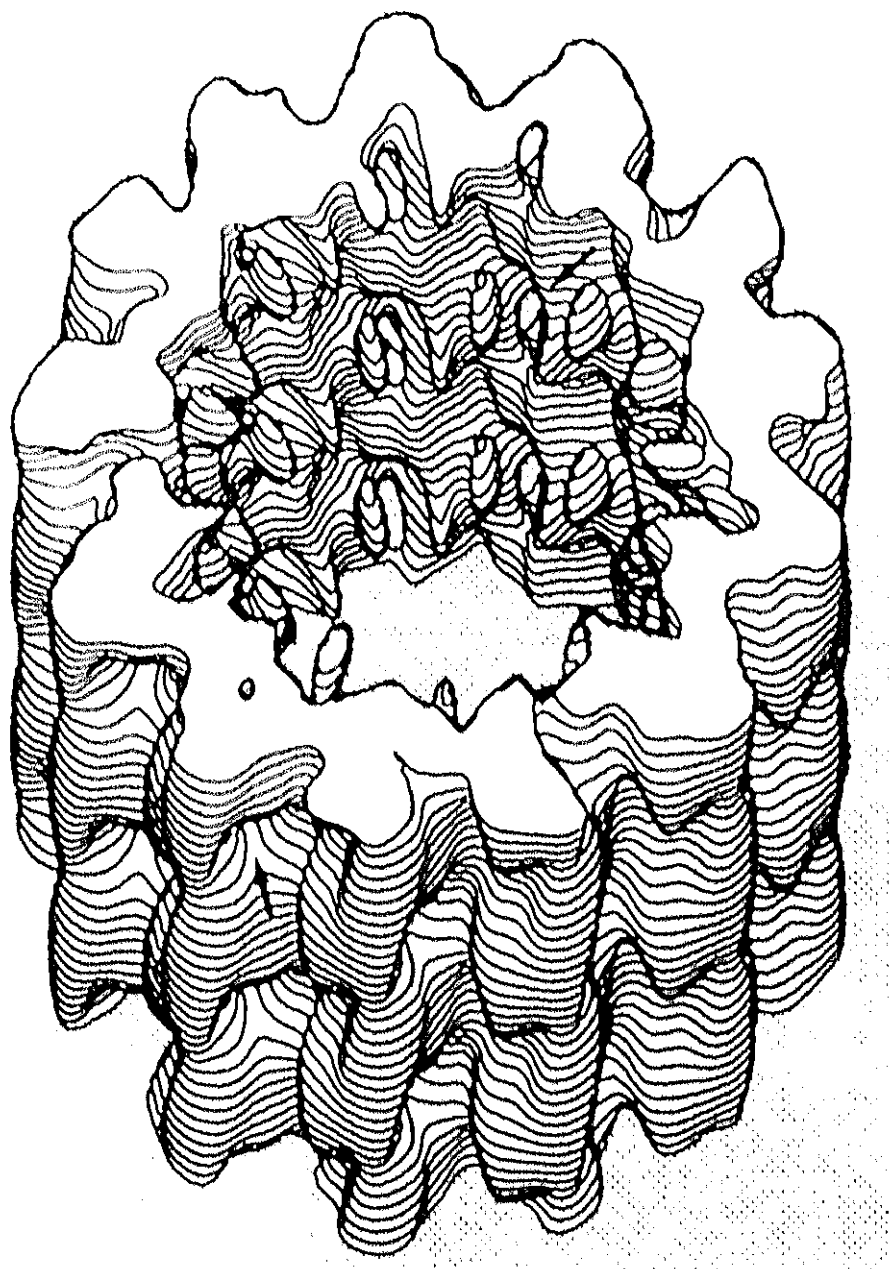


Figura 2. Parte de la pared del modelo refinado de microtúbulos a 1.8 nm de resolución de Boese y col. (1987). Se muestran 2.5 subunidades de cada protofilamento, las secciones están separadas 0.25 nm.

el primer modelo en el que se accede a la subestructura del monómero, por refinamiento de los modelos de monómero obtenidos en el estudio de Mandolkow y col (Mandolkow, Thomas et al. 1977), y del modelo de los protofilamentos obtenido a partir de microscopía electrónica de hojas de tubulina inducidas por Zn^{2+} (Amos y Baker 1979). Tiene la misma red de superficie que los anteriores y se muestra en la figura 2.

Recientemente se está intentando obtener modelos a mayor resolución mediante difracción de electrones de cristales bidimensionales de tubulina inducidos por Zn^{2+} , habiéndose obtenido mapas de proyección a 0.4 nm de resolución (Downing y Jontes 1992). El estudio de estos polímeros ha permitido proponer un modelo de la estructura de la tubulina que alcanza una resolución de 0.65 nm (Nogales, Wolf et al. 1995).

El uso de altas intensidades de rayos-X ha permitido el estudio de la estructura de los microtúbulos en solución, evitando así los problemas de manipulación de la muestra que presenta la difracción de geles orientados. La estructura de los microtúbulos inducidos por taxol en solución muestra que tienen típicamente 12 protofilamentos en una triple hélice de ca. 22 nm de diámetro, similar a la de los microtúbulos ensamblados sin ligando, si bien estos últimos tienen típicamente 13 protofilamentos y ca. 24 nm de diámetro. Así pues el taxol induce una curvatura ligeramente mayor de los contactos laterales entre los heterodímeros de tubulina. Puesto que los microtúbulos de taxol tienen un protofilamento menos con la misma estructura, es necesario tanto en la estructura A como en la B, una discontinuidad en la estructura de la superficie, con distintos contactos laterales en el cierre entre el primer y el último protofilamento (Andreu, Bordas et al. 1992).

3. LA TUBULINA.

Las α -, β - y γ -tubulinas constituyen una familia de proteínas presentes en todas las células eucarióticas, de peso molecular ca. 50 kD y ca. 450 aminoácidos, y que unen nucleótidos de guanina (GTP/GDP). Las α - y β -tubulinas constituyen el heterodímero $\alpha\beta$ (coeficiente de sedimentación 5.8 S), que ensambla reversiblemente formando microtúbulos, de los que es el constituyente mayoritario; mientras que la γ -tubulina está asociada a centrosomas (Joshi 1993).

3.1. SECUENCIA AMINOACIDICA.

Se conocen ca. 200 secuencias génicas de tubulinas de especies evolutivamente distantes, estando altamente conservadas. El grado de conservación, considerando las sustituciones conservativas, alcanza ca. 70% dentro de las subfamilias α y β . La mínima identidad dentro de la subfamilia de α -tubulinas es del 61%, del 67% entre las β , y del 65% en la subfamilia γ . Los niveles de identidad, mínimo y máximo, entre tubulinas de subfamilias diferentes son: 34-41% (α/β), 25-31% (α/γ) y 29-33% (β/γ) (para revisiones ver (Sullivan 1988; Burns 1991; Ludueña, Banerjee et al. 1992)).

La característica más importante de estas secuencias es la presencia de un extremo carboxilo muy ácido, con una marcada heterogeneidad (Little y Seehaus 1988).

3.2. ESTRUCTURA SECUNDARIA.

La estructura secundaria del heterodímero $\alpha\beta$ se ha estudiado por dicroísmo circular (Lee, Corfman et al. 1978; Andreu, De la Torre et al. 1986) y espectroscopia Raman (Audenaert, Heremans et al. 1989), estimándose un contenido de aproximadamente 20% de α -hélice y 35% de estructura β . Si bien estos estudios espectroscópicos de la estructura secundaria no son muy acertados en la determinación de valores absolutos, si son adecuados para la caracterización de cambios relativos. Así la unión de detergentes suaves causa una desnaturalización parcial y una reducción del contenido de α -hélice (Andreu, De la Torre et al. 1986). Mediante espectroscopia Raman se han detectado cambios conformacionales en función del nucleótido unido y del ensamblaje; se ha observado que la forma dimérica con GDP unido es muy parecida a la ensamblada en microtúbulos y estas son diferentes a la forma con GTP (Audenaert, Heremans et al. 1989). Sin embargo los espectros de dicroísmo circular de GTP- y GDP-tubulina son esencialmente idénticos (Shearwin y Timasheff 1992).

3.3. ESTRUCTURA TERCIARIA.

La estructura terciaria a alta resolución de la tubulina se desconoce debido a la falta de cristales apropiados. La cristalización presenta problemas de difícil solución relacionados con la microheterogeneidad, inestabilidad y tendencia a agregar de la proteína (Lobert y Correia 1991).

Alternativamente se han empleado gran variedad de aproximaciones al estudio de la estructura y función de la tubulina. Entre ellos se incluyen la proteólisis limitada, el uso de anticuerpos monoespecíficos, técnicas de modificación y entrecruzamiento químico, etc.

3.3.1. PROTEOLISIS LIMITADA DE TUBULINA.

Los resultados descritos hasta ahora de proteólisis limitada de tubulina indican que el monómero de tubulina consta de 3 tres zonas accesibles a proteasas. Dos de estas zonas de corte son internas y se sitúan a aproximadamente a uno y dos tercios de la cadena respectivamente. Estas zonas definen 3 regiones compactas y resistentes a la digestión, y que en condiciones nativas no se disocian tras la proteólisis (de la Viña, Andreu et al. 1988). Este modelo de 3 regiones es compatible y es una ampliación del modelo de 2 regiones definidas mediante proteólisis limitada con tripsina y quimotripsina (Mandelkow, Herrmann et al. 1985). Aunque no hay razón para que exista una correlación entre dominios estructurales y las regiones definidas en la proteólisis limitada, se ha sugerido que estas 3 regiones podrían corresponder con los 3 dominios del monómero de tubulina observados como regiones de alta densidad electrónica en el modelo a baja resolución de microtúbulos hidratados obtenido mediante difracción de rayos-X (Beese, Stubbs et al. 1987).

Se ha dedicado especial interés al estudio de la proteólisis limitada del extremo carboxilo de la tubulina, siendo conflictivos en algunos casos los resultados descritos en la literatura. Esta región está implicada en la unión de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) MAP2, factor tau y MAP4; ya que su unión se inhibe en la tubulina a la que se le ha eliminado el extremo carboxilo por digestión con subtilisina (Serrano, Avila et al. 1984). Péptidos sintéticos homólogos a las secuencias α (430-441) y β (422-434) se unen a MAP2

y tau (Littauer, Givon et al. 1986; Maccioni, Rivas et al. 1988).

La combinación de proteólisis limitada con experimentos de entrecruzamiento químico ha permitido conocer que la interacción entre α - y β -tubulina en el heterodímero se produce entre los dos tercios amino terminal de la cadena α y el tercio carboxilo de la cadena β . Se puede inferir que la interacción entre heterodímeros a lo largo de un protofilamento se produciría entre el pequeño fragmento carboxilo de α -tubulina y el fragmento amino de β (Kirchner y Mandelkow 1985).

Los residuos de Cys 239 y 354 de β -tubulina, aunque están distantes en la secuencia y se localizan en regiones resistentes a la proteólisis limitada distintas, son entrelazados químicamente por el reactivo N-N'-etilenbis(iodoacetamida), indicando que en la estructura terciaria están separados una distancia máxima de 9 Å (Little y Ludueña 1985). Asimismo la Cys12 de β -tubulina también parece localizarse a una distancia máxima de 9 Å de la Cys201 o de la Cys211 (Little y Ludueña 1987).

3.3.2. ANTICUERPOS DE ESPECIFICIDAD DIRIGIDA FRENTE A TUBULINA.

La utilización de anticuerpos frente a regiones definidas de la molécula de tubulina, bien monoclonales o monoespecíficos, ha permitido deducir ciertas características estructurales y funcionales de estas regiones (para revisión ver (Andreu y de Pereda 1993)).

Se han descrito pocos anticuerpos que reconozcan la región del extremo amino de las tubulinas. El anticuerpo monoclonal 18D6, reconoce específicamente la región β (1-12) y altera la autorregulación de la síntesis de β -tubulina. Este anticuerpo reacciona con microtúbulos fijados y decora la red microtubular de células en las que se inyecta, si no se han extraído con Tritón X-100 (Theodorakis y Cleveland 1992). Las posiciones β (28-38) son accesibles a un anticuerpo específico en el heterodímero, pero quedan ocluidas al polimerizar en microtúbulos, tanto *in vitro* como en células en cultivo (Chène, Mazarguil et al. 1992).

Las secuencias α (120-131) y β (119-129) son principalmente hidrofílicas, si bien anticuerpos frente a péptidos homólogos de estas zonas no reconocen la tubulina, tanto nativa como desnaturalizada (Arévalo, Nieto et al. 1990). El anticuerpo monoclonal TU-01 reconoce una zona de la α -tubulina entre las posiciones 50 a 100, que está inaccesible en microtúbulos

(Dräber, Dräberová et al. 1989). Anticuerpos monoespecíficos frente a $\alpha(155-168)$ reaccionan frente a tubulina nativa heterodimérica, pero no frente a tubulina ensamblada en microtúbulos ni en hojas inducidas por Zn^{2+} . Esto sugiere que este epítipo no estaría situado en el lumen del microtúbulo sino que estaría implicado en las interacciones entre protofilamentos. Sin embargo la secuencia $\beta(153-165)$ permanece accesible a sus anticuerpos específicos en los microtúbulos; estos no inducen perturbaciones del ensamblaje, posiblemente por ser regiones poco flexibles y/o encontrarse en los surcos de la pared del microtúbulo (Arévalo, Nieto et al. 1990). Anticuerpos frente a $\beta(154-165)$, que se encuentra próxima al potencial motivo de unión de fosfato del nucleótido $\beta(142-148)$, inhiben el intercambio de GTP y el ensamblaje (Hesse, Thierauf et al. 1987).

Las secuencias $\alpha(214-226)$ y $\beta(241-256)$ son reconocidas por sus respectivos anticuerpos monoespecíficos en la forma no-ensamblada, y están ocultas en microtúbulos inducidos por taxol, anillos de tubulina, hojas inducidas por Zn^{2+} y citoesqueletos no fijados. Se ha propuesto como modelo que estas zonas están cerca de los contactos axiales entre heterodímeros de la tubulina a lo largo de los protofilamentos. Las posiciones complementarias $\alpha(241-256)$ y $\beta(214-226)$, que no tienen carácter hidrofílico, están posiblemente relacionadas con las regiones de contacto entre subunidades α y β en el heterodímero (Arévalo, Nieto et al. 1990).

Anticuerpos frente a las posiciones $\alpha(415-443)$, $\alpha(430-443)$ y $\beta(412-431)$ se unen a microtúbulos inducidos por taxol; asimismo inducen una perturbación subestequiométrica del ensamblaje de tubulina, en la que se forman haces, apertura de tubos y polimerización en hojas. Esta perturbación no se observa en presencia de los fragmentos Fab de estos anticuerpos, lo que indica la necesidad de la presencia de la bivalencia del anticuerpo y/o la presencia del fragmento Fc. Esto sugiere que las secuencias $\alpha(430-443)$ y $\beta(412-431)$ no son sitios de contacto, sino que están relativamente bien expuestas en los microtúbulos de tubulina purificada (Arévalo, Nieto et al. 1990). Las zonas $\alpha(426-450)$ y $\beta(416-430)$ son reconocidas por anticuerpos específicos tanto en microtúbulos fijados como nativos, reafirmando que se trata de zonas expuestas (Breitling y Little 1986).

3.4. GENÉTICA DE TUBULINAS. ISOTIPOS Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN.

A lo largo de la evolución las tubulinas han sido codificadas por un número creciente de genes, desde 1 o 2 genes en eucariotas inferiores (eg. levaduras), hasta familias multigénicas con al menos 6 o 7 genes funcionales en vertebrados.

3.4.1. GENES DE TUBULINAS EN VERTEBRADOS.

3.4.1.1. α -TUBULINA.

El estudio genético de las α -tubulinas en mamíferos se ha realizado principalmente en ratón. Cowan y col. han caracterizado 6 genes de α -tubulina, $\text{m}\alpha 1$ -7, a partir de librerías de cDNA de esta especie (Villasanto, Wang et al. 1986). Las diferencias entre los productos de expresión se localizan principalmente en los últimos 15 aminoácidos del extremo carboxilo terminal y en menor medida en la región amino terminal, entre las posiciones 35 y 60. Los genes de α -tubulina descritos en ratón están altamente conservados entre las distintas especies de mamíferos estudiadas, a excepción de una α -tubulina de ratón específica de testículos (Hecht, Distel et al. 1988).

$\text{m}\alpha 1$, $\text{m}\alpha 2$ y $\text{m}\alpha 6$ se expresan en múltiples tejidos, si bien $\text{m}\alpha 6$ es minoritario. $\text{m}\alpha 1$ y $\text{m}\alpha 2$ son mayoritariamente isotipos neuronales.

$\text{m}\alpha 3$ y $\text{m}\alpha 7$ codifican la misma proteína y comparten idénticas regiones 3' no expresadas, si bien presentan múltiples diferencias en la tercera posición de los codones y en la región 5' no expresada. La expresión de $\text{m}\alpha 3/7$ es específica de testículos. El gen $\text{h}2\alpha$ de origen humano codifica un α -tubulina idéntica.

$\text{m}\alpha 4$, y su correspondiente gen en humanos $\text{h}\alpha 44$, son expresados minoritariamente en múltiples tejidos. Ambos codifican una α -tubulina con una región carboxilo terminal característica, que a diferencia de los demás isotipos de mamíferos carece de la tirosina en su terminación, y que está implicada en el ciclo posttraduccional de detirosinación/tirosinación (ver abajo).

En aves se han caracterizado 5 genes funcionales que codifican otras tantas α -

tubulinas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5/6$ y $\alpha 8$) (Valenzuela, Quiroga et al. 1981 ; Pratt, Okamura et al. 1987, Pratt y Cleveland 1988). Al igual que en mamíferos estos isotipos son particularmente divergentes en su extremidad carboxilo terminal. Sin embargo a diferencia de las β -tubulinas en las α no existen isotipos conservados entre todos los vertebrados, ni en secuencia ni en patrón de expresión. Tan sólo $\alpha 1$ de aves codifica un isotipo altamente homólogo con la secuencia consenso de los isotipos de mamífero.

$\alpha 1$ y $\alpha 8$ son los dos únicos genes aislados de pollo que codifican residuos de tirosina terminales. Esto contrasta con las α -tubulinas de mamíferos en las que sólo está ausente en un isotipo (ver arriba).

3.4.1.2. β -TUBULINA.

Se han caracterizado, aparentemente por completo, los genes que codifican β -tubulina en vertebrados.

En la década de los años 80 Cleveland y col. clonaron y caracterizaron 7 genes de β -tubulina de pollo ($\beta 1$ -7) que parecen constituir el repertorio completo en esta especie (Valenzuela, Quiroga et al. 1981 ; Sullivan y Cleveland 1984; Sullivan, Lau et al. 1985; Sullivan y Cleveland 1986; Sullivan, Machlin et al. 1986; Murphy, Wallis et al. 1987; Monteiro y Cleveland 1988). Los 7 genes codifican 6 isotipos polipeptídicos distintos, ya que los productos de expresión de $\beta 1$ y $\beta 2$ sólo difieren en 2 sustituciones conservativas. Las diferencias entre isotipos afectan sólo a aproximadamente el 16% de los residuos. Los isotipos están definidos inicialmente por su característica secuencia del extremo carboxilo, a partir de la posición 430, y en menor medida por una región variable comprendida entre las posiciones 30 y 60.

El estudio en mamíferos de los genes de β -tubulina se ha realizado en varias especies. Cowan y col. han realizado un estudio exhaustivo de librerías de cDNA de ratón y han caracterizado 5 genes funcionales ($m\beta 1$ -5) (Lewis, Lee et al. 1985; Wang, Villasante et al. 1986). De origen humano se ha demostrado la existencia de 6 genes funcionales que codifican β -tubulina, así como múltiples pseudogenes.

Considerando las secuencias disponibles de β -tubulina de diversas especies de

vertebrados, se observan 4 isotipos altamente conservados, con características secuencias a partir de la posición 430. Se denominan clases I a IV, además de éstos existen otros 2 isotipos, las clases V y VI.

La expresión de los isotipos de β -tubulina es compleja y está altamente conservada. La clase I tiene un patrón de expresión ubicuo, siendo un isotipo constitutivo. La clase II también se expresa en múltiples tejidos, si bien es mayoritaria en cerebro ($c\beta 2$, $m\beta 2$) y abunda en músculo esquelético ($c\beta 1$) y pulmón ($m\beta 2$). La clase III se expresa específicamente en tejido neuronal, en el cual es minoritario (Lewis, Lee et al. 1985; Monteiro y Cleveland 1988).

En mamíferos existen 2 genes muy similares que codifican β -tubulina de clase IV, pero presentan diferentes patrones de expresión, según lo cual se ha subdividido en clase IVa y IVb. En la variante IVa se incluyen los genes cuya expresión es específica de tejido neuronal eg. $m\beta 4$ y $h\beta 5$ (Lewis, Lee et al. 1985). En la subclase IVb se incluyen el gen $m\beta 3$ de ratón, expresado en múltiples tejidos siendo mayoritario en testículos y prácticamente ausente en cerebro (Wang, Villasante et al. 1986); y el gen $h\beta 2$ expresado en numerosas líneas celulares humanas; sugiriendo para esta subclase un papel aparentemente constitutivo. En aves sólo se conoce un gen de clase IV, $c\beta 3$, que está ampliamente expresado y es mayoritario en testículos. Por el patrón de expresión se ha incluido en la subclase IVb, estando aparentemente ausente la subclase IVa en aves.

En la clase V la única secuencia conocida corresponde al gen $c\beta 5$ de aves. Está expresado de forma minoritaria en múltiples tejidos excepto en neuronas, si bien anticuerpos específicos frente a este isotipo revelan la presencia de isotipos similares en ratón y rata (Lopata y Cleveland 1987).

Por último la clase VI comprende β -tubulinas, que a diferencia de los otros isotipos, son divergentes y heterogéneas entre sí en su región carboxilo terminal. En esta clase se incluyen los productos de expresión de los genes $c\beta 6$ de aves, específico de eritrocitos y que ensambla formando parte de los microtúbulos de la banda marginal en células eritroides nucleadas. Y $m\beta 1$, aislado de una librería de cDNA de médula ósea de ratón y que se expresa exclusivamente en órganos implicados en la hematopoyésis, principalmente en el bazo. Se ha propuesto la participación del producto de expresión de $m\beta 1$ en la formación de las bandas marginales en mamíferos (Wang, Villasante et al. 1986). Estas dos β -tubulinas

hematopoyéticas constituyen una excepción frente a los isotipos conservados.

3.4.2. SIGNIFICACIÓN FUNCIONAL DE LOS ISOTIPOS DE TUBULINA.

Se han descrito ejemplos tanto de equivalencia funcional entre isotipos de tubulina como de especialización funcional.

3.4.2.1. EJEMPLOS DE REDUNDANCIA FUNCIONAL DE ISOTIPOS.

En *Aspergillus nidulans* se han descrito dos genes de β -tubulina (benA y TubC), cuyos productos de expresión respectivos sólo tienen un 83% de identidad de secuencia entre sí. Cada uno de los isotipos tiene un patrón de expresión propio: benA es el isotipo expresado durante el crecimiento mitótico normal, mientras que TubC se expresa exclusivamente durante procesos de esporulación asexual o formación de conidios. Estos dos isotipos son funcionalmente intercambiables, ya que mutaciones en benA se pueden compensar con una mayor expresión de TubC, durante el período vegetativo. Asimismo mutantes que no expresan TubC no presentan un fenotipo observable (May 1989).

En *Saccharomyces cerevisiae* existen dos genes de α -tubulina, TUB1 que es esencial y TUB3. Entre los productos de expresión sólo existe un 80% de identidad. También en este caso parecen ser isotipos intercambiables, ya que mutaciones en TUB1, gen esencial, pueden complementarse con una mayor expresión de TUB3. Un proceso similar se ha descrito para otras levaduras como *Schizosaccharomyces pombe*.

3.4.2.2. EJEMPLO DE FUNCIÓN ESPECIALIZADA DE ISOTIPOS.

Hoyle y Raff (Hoyle y Raff 1990) han descrito la funcionalidad selectiva de isotipos de β -tubulina en *Drosophyla*.

Se han descrito 4 genes en *Drosophyla melanogaster* y se ha definido el patrón de

expresión de tres de ellos. $\beta 1$ se expresa de forma amplia y predominante excepto en unos pocos tejidos como las células postmitóticas de la línea germinal en el macho. $\beta 2$ es específico de las células post-mitóticas de la línea germinal en el macho. $\beta 3$ tiene un patrón de expresión temporal y espacial complejo, si bien no aparece en células germinales. $\beta 3$ es un isotipo altamente divergente, con sólo un 72% de homología con los otros isotipos, y parece estar implicado en la formación de microtúbulos citoplasmáticos implicados en el mantenimiento de la forma celular.

Cuando $\beta 3$ se expresa en células germinales de macho, en ausencia de la isoforma endógena $\beta 2$, mantiene el ensamblaje de una sola clase de microtúbulos citoplasmáticos transitorios. Esto parece ser consecuencia de una función especializada del isotipo $\beta 3$, ya que en las células en las que se expresa normalmente interviene en este tipo de estructuras.

Cuando $\beta 3$ se coexpresa con $\beta 2$, no se alteran las funciones de $\beta 2$ en el ensamblaje del uso mitótico, ni de microtúbulos citoplasmáticos implicados en elongación mitocondrial y forma nuclear. Sin embargo cuando $\beta 3$ se expresa en una proporción superior al 20% de la β -tubulina total, causa un defecto específico del axonema y origina un fenotipo estéril. Los tubos dobles del axonema adquieren características morfológicas del par central sencillo y los microtúbulos accesorios del axonema, quizás reflejo de la función del isotipo $\beta 3$ que forma microtúbulos citoplasmáticos sencillos.

3.4.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TUBULINA.

Se conoce desde hace tiempo que la síntesis *de novo* de tubulina *in vivo* está regulada negativamente por los niveles citoplasmáticos de tubulina no polimerizada (Ben, Farmer et al. 1979; Cleveland, Lopata et al. 1981). Este mecanismo de autorregulación conlleva un descenso en el nivel de mRNA de β -tubulina, por un aumento de la inestabilidad del mRNA unido a ribosomas. Esta inestabilidad es un proceso posttraduccional ligado a la expresión de los 4 primeros aminoácidos de las β -tubulinas, Met-Arg-Glu-Ile. La secuencia de nucleótidos no es importante *per se* y proteínas quiméricas en las que se introduce esta secuencia, exclusiva de β -tubulinas, en su extremo amino se hacen sensibles a este proceso de autorregulación (Yen, Machlin et al. 1988).

El extremo amino nascente de la β -tubulina debe unirse a un factor celular para inducir la inestabilidad de su mRNA, ya que su bloqueo mediante anticuerpos específicos previene la autorregulación. Inicialmente se pensó que este factor era el propio dímero de tubulina, pero no se ha detectado unión de un péptido correspondiente a la región $\beta(1-12)$ al heterodímero (Theodorakis y Cleveland 1992).

3.5. MODIFICACIONES POSTTRADUCCIONALES.

La tubulina puede sufrir diversas modificaciones post-traduccionales que aumentan la heterogeneidad y el tipo de isoformas.

3.5.1. ACETILACIÓN.

L'Hernault y Rosenbaum (L'Hernault y Rosenbaum 1983) observaron en *Chlamydomonas* la presencia de dos subpoblaciones de α -tubulina, con distinto punto isoeléctrico. Una es específica del axonema, relacionándola con la morfogénesis flagelar, y la otra es su precursor. La forma axonémica se produce por una modificación post-traducciona del precursor, pudiéndose marcar en presencia de acetato titrado e inhibidores de la síntesis proteica. Esta modificación es reversible, tal como ocurre durante la resorción flagelar (L'Hernault y Rosenbaum 1985).

La acetilación de la α -tubulina se produce específicamente sobre el grupo ϵ -amino de la Lys en posición 40, siendo esta la única modificación post-traducciona que se produce fuera de la región carboxilo terminal de la tubulina (L'Hernault y Rosenbaum 1985; LeDizet y Piperno 1986). La forma acetilada está presente principalmente en la fracción polimerizada, sobre la cual parece producirse (Piperno, LeDizet et al. 1987).

El estudio inmunocitoquímico de la α -tubulina acetilada, gracias a anticuerpos específicos frente a esta modificación (Woods, Sherwin et al. 1989; LeDizet y Piperno 1991), ha permitido relacionar en células de mamífero esta modificación con subpoblaciones de microtúbulos resistentes a la despolimerización inducida por drogas, pero no por frío (LeDizet

y Piperno 1986, Piperno, LeDizet et al. 1987).

3.5.2. TIROSINACIÓN, DETIROSINACIÓN Y TUBULINA NO TIROSINABLE.

La α -tubulina es susceptible de entrar en un ciclo de eliminación y readición del residuo de tirosina de su extremo carboxilo. Este ciclo se produce tanto en los isotipos de α -tubulina que codifican una tirosina en esta posición terminal como los que carecen de ella.

La detirosinación se debe a la acción de una tubulina carboxipeptidasa específica. La enzima actúa tanto sobre la forma polimerizada como sobre el heterodímero, si bien es dos a tres veces más activa sobre la primera (Kumar y Flavin 1981).

La readición del grupo tirosilo es realizada por una tubulina tirosina ligasa que actúa preferentemente sobre la α -tubulina soluble (Wehland y Weber 1987), siendo una reacción dependiente de ATP.

In vitro, aún en condiciones óptimas de tirosinación, ésta sólo se produce en el 50% de la α -tubulina (Paturlo, Wehland et al. 1989). Esto puso en evidencia la existencia *in vitro* de una subpoblación de α -tubulina no tirosinable, también observada *in vivo* (Barra, Arco et al. 1980). Paturlo y col. (Paturlo, Eddé et al. 1991) han caracterizado esta variante de α -tubulina, que no reacciona con anticuerpos específicos de las formas tirosinadas y detirosinadas. La α -tubulina no tirosinable está modificada post-traduccionalmente y carece del dipéptido carboxilo terminal Glu-Tyr. Se ha propuesto que la eliminación del residuo Glu450 impediría la actuación de la tubulina tirosina ligasa y así esta población no entraría en el ciclo de tirosinación detirosinación. Por el momento se desconocen los mecanismos enzimáticos implicados en esta modificación post-traduccional proponiéndose dos posibles rutas: una a partir de la forma detirosinada mediante la participación de carboxipeptidasas; otra posibilidad es que se produzca directamente a partir de la forma tirosinada mediante una dipéptido carboxipeptidasa.

3.5.3. FOSFORILACIÓN.

Es conocida la capacidad de la tubulina de ser fosforilada por diversas enzimas. Una

proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina es capaz de fosforilar ambas subunidades de tubulina. La fosforilación se localiza en la región carboxilo terminal, aparentemente en residuos de Ser. La fosforilación inhibe la capacidad de polimerización *in vitro* así como la capacidad de unión a MAP2 (Wandosell, Serrano et al. 1986).

Serrano y col. (Serrano, Diaz Nido et al. 1987) han descrito la fosforilación de la β -tubulina por la casein quinasa II. Esta se produce en un residuo de Ser de la región carboxilo terminal, y a diferencia de la anterior la forma fosforilada mantiene la capacidad de polimerización.

Se ha descrito que el producto del proto-oncogén *mos*, denominado pp39^{mos}, es una proteína quinasa que se asocia a la tubulina, preferentemente a la subunidad β a la que fosforila (Zhou, Oskarsson et al. 1991). Asimismo la proteína pp60c-src es una tirosina quinasa, expresada preferentemente en tejido neuronal embrionario, capaz de fosforilar la tubulina (Matten, Aubry et al. 1990).

En el isotipo β -III se ha identificado con precisión la Ser444 como el punto mayoritario de fosforilación, y en menor medida la Tyr437 (Alexander, Hunt et al. 1991). Este isotipo se caracteriza por tener una región carboxilo terminal menos ácida. La fosforilación aumenta la carga negativa de esta región. El significado funcional de esta modificación se desconoce, la única relación descrita es el acompañamiento de la fosforilación a la inducción de la diferenciación en células de neuroblastoma (Gard y Kirschner 1985).

3.5.4. POLIGLUTAMILACIÓN.

Se ha descrito la incorporación post-traducciona de residuos de glutamato a la tubulina. En los isotipos de α -tubulina $\text{m}\alpha 1$ y $\text{m}\alpha 2$ se ha observado la presencia de 1 a 5 residuos de glutamato unidos covalentemente a través del grupo γ -carboxilo del residuo Glu445. Esta modificación es mayoritaria en la α -tubulina neuronal (Eddé, Rossier et al. 1990). El estudio de la estructura de la cadena poliglutamilada revela que en las formas bi- y triglutamiladas las uniones entre los residuos glutamilo se produce a través del grupo α -carboxilo (Redeker, Le Caer et al. 1991).

Las β -tubulinas también son susceptibles de sufrir glutamilación. Se ha descrito la adición de 1 a 6 residuos de glutamato sobre el Glu438 del isotipo neuronal β -III, siendo mayoritarias en cerebro bovino adulto las formas glutamiladas (Alexander, Hunt et al. 1991). También se ha observado glutamilación en el residuo Glu435 del isotipo II, mayoritario en cerebro (Redeker, Melki et al. 1992; Rüdiger, Plessman et al. 1992).

La poliglutamilación de la tubulina es independiente de otras modificaciones post-traduccionales. La α -tubulina puede entrar en el ciclo de tirosinación detirosinación independientemente de su grado de glutamilación. La mayor parte de la forma tirosinada está también glutamilada (Eddé, Rossier et al. 1992). Aproximadamente el 10% de las formas glutamiladas de la clase III de β -tubulina están también fosforiladas (Alexander, Hunt et al. 1991).

La distribución de la poliglutamilación de la tubulina en diferentes tejidos ha sido posible gracias a la obtención de un anticuerpo específico, GT355, que reacciona con los motivos monoglutamilados con el grupo γ -carboxilo libre, principalmente de la α -tubulina y con menor afinidad de la β (Wolff, de Néchaud et al. 1992). En cerebro, tanto en neuronas como en células gliales, se ha observado glutamilación en α - y β -tubulina. Si embargo en tejidos no neuronales la glutamilación parece estar restringida a la cadena β .

3.5.5. POLIGLICILACIÓN.

Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de modificación post-traducciona, detectada en la región carboxilo terminal de tubulina de axonema de *Paramecium*. Las cadenas de α - y β -tubulina están modificadas por la adición de 3 a 34 residuos de glicina. Potencialmente la poliglicilación se produce en los residuos Glu445 de α -tubulina y Glu437 de β , si bien no se excluye la posibilidad de que se produzca también sobre otros residuos ácidos de la región carboxilo terminal. Esta modificación es detectada específicamente por el anticuerpo policlonal anti-PA y por el monoclonal AXO49. Su uso parece indicar que la poliglicilación puede ser una modificación de axonemas tanto de protozoos como de metazoos. Asimismo esta modificación parece estar asociada a sistemas de microtúbulos estables. La estabilización podría deberse a un descenso en el carácter ácido del extremo

carboxilo de la tubulina (Redeker, Levilliers et al. 1994).

3.6. EL SITIO DE UNIÓN DE NUCLEOTIDO.

La tubulina une dos moléculas de nucleótido de guanina por cada heterodímero (Weisenberg, Borisy et al. 1968). Una molécula no intercambiable de GTP en la subunidad α (Giehlen y Haley 1977) y que sólo puede ser eliminada por desnaturalización de la proteína (sitio N), y una molécula intercambiable que puede ser de GDP o GTP en la subunidad β (sitio E) (Nath, Baglo et al. 1985), que se vuelve no intercambiable en el estado ensamblado.

La identificación de las regiones implicadas en el sitio de unión de GTP se ha abordado teóricamente mediante la búsqueda de secuencias consenso de zonas implicadas en la unión de nucleótido en proteínas que unen GTP y en proteínas que unen otros nucleótidos como ATP, observándose homologías con estos dos tipos de proteínas. Se han obtenido evidencias directas de esta interacción principalmente mediante fotomarcaje y mutagénesis dirigida.

La supuesta similitud estructural de la tubulina con proteínas de la superfamilia de las GTPasas está apoyada por la presencia de tres regiones, conservadas en las tubulinas, con homología con los sitios de unión: dos están implicadas en la unión de fosfatos y una se relaciona con la interacción con la base púrica (tabla 1).

La región 102-109 de β -tubulina se ha identificado habitualmente (Sternlicht, Yaffe et al. 1987) con el motivo de secuencia GX₄GK(S/T), que forma parte del sitio de unión de nucleótido en proteínas de la superfamilia de las GTPasas (Bourne, Sanders et al. 1991). Para la correcta identificación es preciso invertir el sentido de lectura de la secuencia. En la GTPasa p21^{ras} esta región es un bucle que enlaza un segmento β hidrofóbico con una α -hélice anfipática. Hidrógenos de grupos amino de la cadena principal de esta región y el grupo ϵ -amino de la Lys interaccionan con los fosfatos α y β del GTP y GDP. La mutación de Lys103 por una Met no afecta significativamente la actividad GTPasa de β -tubulina de

Saccharomyces cerevisiae (Davis, Sage et al. 1994). Sin embargo la sustitución de Lys por Met en el motivo GX₄GK(S/T) de p21^{ras} reduce su actividad GTPasa (Sigal, Gibbs et al. 1986). También se ha estudiado la transcendencia de la Thr107, ya que esta posición del motivo modula la actividad GTPasa en otros miembros de la superfamilia (Valencia, Chardin et al. 1991). La sustitución de Thr107 por Gly, Lys o Trp en β -tubulina de *S. cerevisiae* conlleva un aumento de la actividad GTPasa y un consecuente aumento de la concentración crítica de polimerización. En consecuencia se ha propuesto la equivalencia funcional de la región 102-109 de β -tubulina con el motivo de las GTPasas, a pesar de aparecer invertido (Sage, Davis et al. 1991, Davis, Sage et al. 1994).

Tabla 1. Regiones de β -tubulina con homología de secuencia con motivos de unión de nucleótido en GTPasas.

Región Tubulina ^a	Secuencia Tubulina ^{a, b}	Motivo funcional Secuencia consenso ^c	Función
β (102-109)	AKGHYTEG ↓ Invertido	GxxxxGK(S/T)	Unión de fosfatos α y β
β (203-206)	DNEA	DxxG	Unión de fosfato- γ (Gly) Unión de Mg ²⁺ (Asp)
β (295-301)	DAKNMMAA ↓ Invertido	oooo(N/T)(K/Q)xD	Unión de guanina
β (58-67)	KYVPRAILVD		Unión de guanina en el factor de elongación Tu ^d

^a Secuencia de β -tubulina de cerebro porcino (Kraufs, Little et al. 1981).

^b Los residuos subrayados indican las posiciones coincidentes con la secuencia consenso del motivo.

^c 'x' indica un residuo variable, 'o' indica un residuo hidrofóbico.

^d (la Cour, Nyborg et al. 1985).

La secuencia ²⁰¹DNEA²⁰⁶ de β -tubulina se ha identificado con el motivo de secuencia DX₂G, conservado en todas las GTPasas. La sustitución de la Gly por Ala se considera un cambio conservativo. En p21^{ras} el Asp de esta región se une al Mg²⁺ catalítico a través de una molécula de agua, y el grupo amino de la Gly forma un puente de hidrógeno con el fosfato γ del GTP. La mutación del Asp203 por Asn en β -tubulina, expresada en lisado de reticulocitos de conejo, reduce la afinidad de la unión de nucleótido sin alterar la especificidad ni la necesidad de Mg²⁺ en la unión del GTP. Si bien este mutante parece tener perturbaciones conformacionales, los resultados de unión de nucleótido descartan una interacción específica del Asp203 con el Mg²⁺ coordinado con el GTP (Farr y Sternlicht 1992). La sustitución del Asp203 por Ser en β -tubulina de *S. cerevisiae* no altera la afinidad por el GTP, ni la hidrólisis asociada al ensamblaje, ni los parámetros cinéticos de la polimerización *in vitro*. Si la región ²⁰¹DNEA²⁰⁶ de β -tubulina estuviera implicada en la coordinación del Mg²⁺, tanto la unión como la hidrólisis del nucleótido deberían alterarse. En consecuencia esta región no es equivalente al motivo DxxG presente en otras GTPasas (Sage, Dougherty et al. 1995).

La región de interacción con la guanina en GTPasas consiste en cuatro residuos hidrofóbicos seguidos de la secuencia consenso (N/T)(K/Q)XD (Bourne, Sanders et al. 1991). En β -tubulina se ha identificado este motivo con la región 295-301, para lo cual es preciso invertir el sentido de lectura de la secuencia. En la estructura de p21^{ras} esta secuencia forma un segmento hidrofóbico de lámina β seguido de un bucle hidrofílico. Mutaciones en esta región de las proteínas p21 y EF-Tu reducen marcadamente la afinidad de unión del GTP (Sigal, Gibbs et al. 1986). La sustitución del Asp138 por Asn en EF-Tu cambia su especificidad hacia la unión del nucleótido trifosfato de xantina, XTP (Hwang y Miller 1987). De forma análoga la mutación del Asp119 por Ala en p21^{ras} cambia su especificidad hacia nucleótidos de inosina, ITP (Sigal, Gibbs et al. 1986). La mutación del Asp295 por Asn en β -tubulina no afecta la afinidad por el GTP y el GDP respecto a la forma silvestre, sugiriendo que este residuo no participa en la unión del nucleótido (Farr y Sternlicht 1992). En β -tubulina de *S. cerevisiae* la sustitución del Asp295 por Asn no altera apreciablemente la afinidad de unión del GTP, ni se observa una mayor afinidad por XTP. Las mutaciones del Asn298 por Lys o Gln tampoco alteran la unión del GTP (Sage, Dougherty et al. 1995).

Opuestamente la sustitución del Asn119 por Lys en p21^{ras} suprime la capacidad de unir GTP en esta proteína (Clanton, Hattori et al. 1986). En consecuencia se ha propuesto que la región 295-298 de β -tubulina no participa directamente en la unión del nucleótido o al menos no lo hace de forma equivalente al motivo (N/T)(K/Q)xD presente en numerosas GTPasas (Sage, Dougherty et al. 1995).

Por comparación con la secuencia de EF-Tu, se ha propuesto que una cuarta región, correspondiente a las posiciones 58-67 de β -tubulina, estaría implicada en la unión de la guanina del nucleótido (Linse y Mandelkow 1988). Sin embargo esta región está poco conservada en las tubulinas.

Un modelo alternativo supone que la tubulina está relacionada con proteínas que unen otros nucleótidos, concretamente ATP/ADP. Se detectan 4 o 5 regiones con homología con motivos funcionales implicados en la unión de la base, la ribosa y los fosfatos del nucleótido (tabla 2).

La región 140-146 de β -tubulina contiene una secuencia rica en Gly, GGGTGSG, característica de las tubulinas y de la proteína bacteriana FtsZ. Se ha relacionado con la secuencia GX₃GXG que forma parte del motivo de Rossmann presente en proteínas que unen ATP/ADP (ver (Schulz 1992)). Este motivo está implicado en la unión del fosfato y la regulación del acceso del nucleótido. Estructuralmente se trata de un bucle flexible que enlaza un elemento de lámina β con una α -hélice.

En proteínas que unen ATP, la unión del Mg²⁺ implicado en la interacción del nucleótido trifosfato se produce a través de los residuos ácidos de la secuencia consenso: "hidrofóbico-variable-aromático-variable-ácido" (Burke, Rajasekharan et al. 1990). En β -tubulina la región 220-224, altamente conservada, es homóloga con este motivo. La mutación del residuo Asp224 por Asn reduce la afinidad por el GTP en presencia de Mg²⁺, mientras que no altera la afinidad por el nucleótido trifosfato en ausencia del catión. El Asp224 participa directamente en la unión del Mg²⁺ o se localiza en las proximidades. Este resultado sugiere la relación evolutiva de las tubulinas con las proteínas que unen ATP (Farr y Sternlicht 1992).

Se han descrito varios estudios de localización mediante fotomarcaje de regiones de

tubulina implicadas en el sitio de unión de nucleótido. La incorporación por fotoafinidad directa de [$\alpha^{32}\text{P}$] GTP se produce mayoritariamente en el péptido 63-77 de β -tubulina (Linse y Mandelkow 1988). Esta región tiene homología de secuencia con la parte del sitio de unión de nucleótido próxima a la base en el factor de elongación Tu (Leberman y Egner 1984). La unión covalente por fotoafinidad del derivado [$\gamma^{32}\text{P}$] 8-azido-GTP se produce principalmente en el fragmento 63-72 de β -tubulina (Kim, Ponstingl et al. 1987). Este resultado apoya la hipótesis de que esta región de la cadena β interacciona o está próxima a la purina del nucleótido unido.

Otros resultados identifican en la región 155-162 de β -tubulina el punto mayoritario de fotomarcado directo con [$\alpha^{32}\text{P}$] GTP (Hesse, Thierauf et al. 1987). Aunque esta región no muestra homología con los sitios de unión de nucleótido, está próxima a la secuencia rica en Gly, supuestamente implicada en la unión del fosfato del nucleótido o en la regulación de su acceso, por homología con proteínas que unen ATP. Este resultado está en discrepancia con el observado por Linse y Mandelkow (ver arriba). Ambos resultados se reconcilian suponiendo que en el estudio de Hesse y col. el fotomarcado se produce a través de la ribosa del nucleótido.

En un reciente estudio de fotomarcado de tubulina con [^3H] GTP se ha identificado la Cys12 de la cadena β como el punto de unión mayoritario (Shivanna, Mejillanos et al. 1993). Asimismo el péptido 3-19 de β -tubulina es la región mayoritariamente fotomarcada con el derivado [$\gamma^{32}\text{P}$]-8-azido-GTP (Jarayam y Haley 1994). La sugerencia de que la Cys12 de β -tubulina forma parte del sitio de unión del GTP está apoyada por anteriores estudios de entrecruzamiento químico. El reactivo bifuncional N',N'-etilen-bis-iodoacetamida enlaza la Cys12 con la Cys201 o la Cys211, de β -tubulina, sólo si se elimina el GTP del sitio de unión E o sitio intercambiable (Little y Ludueña 1987).

Tabla 2. Regiones de β -tubulina con homología de secuencia con motivos de unión de nucleótido en ATPasas.

Región Tubulina ^a	Secuencia Tubulina ^{a,b}	Motivo funcional Secuencia consenso ^c	Función
β (67-70)	DLEP		Unión de guanina
β (140-146)	GGGTGSG	GxxGxG	Unión de fosfato o Regulación acceso nucleótido
β (178-181)	TVVE		Unión de ribosa
β (220-224)	PTYGD	Hidrofóbico-X-Aromático- X-Acido	Unión de Mg ²⁺
β (240-244)	LRFPG		Unión de guanina

^a Secuencia de β -tubulina de cerebro porcino (Krauks, Little et al. 1981).

^b Los residuos subrayados indican las posiciones coincidentes con la secuencia consenso del motivo.

^c x indica un residuo variable.

4. PROTEÍNAS ASOCIADAS A MICROTUBULOS.

Cuando se purifican microtúbulos mediante ciclos de ensamblaje-desensamblaje se observa que junto a la tubulina copurifican una serie de proteínas denominadas genéricamente proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (Sloboda, Rudolph et al. 1975). Estas proteínas afectan a la función de los microtúbulos, regulan la polimerización y despolimerización de éstos, y la interacción de los microtúbulos con otros elementos del citoesqueleto (Vallee 1990). Mediante microscopía electrónica se ha observado que las MAPs aparecen como proyecciones delgadas y fibrosas sobre la superficie de los microtúbulos (Murphy y Borissy 1975). Se distinguen principalmente 4 tipos de MAPs: MAP 1, MAP 2, MAP 4 y factor Tau.

Las MAP 2 son proteínas de alto peso molecular, ca. 280 kD, que se caracterizan por ser inusualmente termoestables permaneciendo soluble después de hervir una preparación de microtúbulos (Fellous, Francon et al. 1977). Son proteínas alargadas y fibrosas, con un pequeño dominio de unión a microtúbulos y una larga "cola". La unión a los microtúbulos parece que se produce a través de 3 secuencias conservadas, de 18 aminoácidos separadas por espaciadores de 13 residuos menos conservados (Lewis, Wang et al. 1988). Se han observado secuencias similares en tau (Lewis, Wang et al. 1988) y en MAP 4 (Aizawa, Emori et al. 1991).

La región de la tubulina implicada en la interacción con las MAPs se localiza en el extremo carboxilo terminal. Péptidos correspondientes a las secuencias de tubulina α (430-441) y β (422-434) inhiben la polimerización inducida por MAPs y la unión de MAP-2 y tau (Maccioni, Rivas et al. 1988). Cuando la tubulina es digerida selectivamente por subtilisina en el extremo carboxilo se inhibe la unión de MAP 2, indicando que en los fragmentos eliminados se localiza el sitio de unión (Serrano, Avila et al. 1984). Si bien Melki y col. han observado que la digestión con subtilisina no inhibe totalmente la unión de MAPs lo que sugeriría que la unión no se restringe exclusivamente al extremo carboxilo (Melki, Kerjan et al. 1991).

5. MOTORES MICROTUBULARES.

Los motores microtubulares son proteínas que utilizan los microtúbulos como soporte para transportar sobre ellos componentes celulares internos. Existen dos tipos fundamentales de motores microtubulares, cada uno incluye diversos miembros con funciones especializadas. Un grupo son las dineinas citoplasmáticas (Vallee y Shpetner 1990), el otro es la familia de las kinesinas (Hoyt 1994).

Las dineinas citoplasmáticas son motores que se desplazan hacia el extremo de crecimiento lento de los microtúbulos (Paschal y Vallee 1987). Las dineinas presentan en su secuencia múltiples secuencias consenso con motivos de unión de nucleótido (Gibbons, Gibbons et al. 1991), y presentan actividad ATPasa, cuya hidrólisis cíclica es la base del movimiento siendo la liberación del ADP la etapa cinéticamente limitante (Holzbaur y Johnson 1989). La dineina parece interaccionar con el extremo carboxilo terminal de la α - y la β -tubulina, compitiendo por el mismo o por un sitio de unión próximo al de la proteína asociada a microtúbulos MAP2 (Paschal, Obar et al. 1989).

La familia de las kinesinas se caracteriza por que sus miembros comparten un dominio motor común, en el que hay regiones altamente conservadas implicadas en la unión de ATP y en la interacción con los microtúbulos. La kinesina se desplaza del extremo de crecimiento lento de los microtúbulos al rápido, gracias a un proceso cíclico de unión de ATP, hidrólisis e intercambio del producto (Gilbert, Webb et al. 1995). La kinesina interacciona preferentemente con la β -tubulina (Song y Mandelkow 1993; Kikkawa, Ishikawa et al. 1994), a partir de estudios de microscopía electrónica de microtúbulos decorados con el dominio motor de la kinesina, se ha propuesto que la unión se produce en la cresta de los protofilamentos sugiriendo que el movimiento se produce a lo largo de un único protofilamento (Hirose, Lockhart et al. 1995; Kikkawa, Ishikawa et al. 1995).

6. LA PROTEÍNA DE DIVISION CELULAR BACTERIANA FtsZ

El gen *ftsZ* forma parte de los genes de "filamentación sensible a temperatura" en *Escherichia coli*. Su producto de expresión, FtsZ, es un componente esencial de la maquinaria

de división celular (de Boer, Cook et al. 1990). La sobreexpresión de FtsZ conlleva una estimulación de la división bacteriana en los polos celulares y un fenotipo caracterizado por la formación de minicélulas anucleadas (Bi y Lutkenhaus 1991). La inhibición de FtsZ, mediante los productos de expresión de Sula y MinCD, paraliza la división celular y produce la consecuente filamentación (Bi y Lutkenhaus 1993).

Mediante inmunomicroscopía electrónica se ha observado que FtsZ está uniformemente distribuida en el citoplasma de las células cuando éstas no se están dividiendo. FtsZ se concentra en un anillo citokinético en la zona de división en *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Este anillo se forma antes de apreciarse la invaginación y no desensambla hasta completarse la división (Bi y Lutkenhaus 1991). En base a esta localización dinámica se ha propuesto un modelo en el que FtsZ autoensambla en una estructura anular en la zona de división celular (Lutkenhaus 1993).

6.1. UNIÓN E HIDRÓLISIS DE NUCLEÓTIDO.

En ausencia de nucleótidos exógenos FtsZ copurifica con GDP unido de forma no covalente, con una estequiometría de ~0.7 mol de nucleótido por mol de FtsZ (RayChaudhuri y Park 1992). En extractos celulares de *E. coli* el fotomarcado de FtsZ con [α - 32 P] GTP es inhibido por un exceso de GTP o GDP no marcados, mientras que dGTP, GMP, ATP, CTP y UTP no lo inhiben. La capacidad de unir GTP se mantiene en la proteína purificada y requiere la presencia de un catión monovalente, Na⁺ o K⁺, pero no de Mg²⁺ (de Boer, Crossley et al. 1992; RayChaudhuri y Park 1992; Mukherjee, Dai et al. 1993).

FtsZ presenta actividad GTPasa que es dependiente de la concentración de proteína, lo que sugiere que la hidrólisis de GTP a GDP está relacionada con un proceso de autoasociación (de Boer, Crossley et al. 1992; Mukherjee, Dai et al. 1993; Wang y Lutkenhaus 1993). En FtsZ de *E. coli* se detecta un retraso en la aparición de esta actividad *in vitro*, en la proteína purificada de *B. subtilis* este retraso no se observa (Wang y Lutkenhaus 1993). En presencia de un exceso de EDTA se inhibe la actividad GTPasa, lo que indica la necesidad de Mg²⁺ para la hidrólisis del nucleótido (RayChaudhuri y Park 1992), que también requiere la presencia de potasio (Mukherjee, Dai et al. 1993). Se ha

propuesto la presencia de dos etapas en el proceso de hidrólisis: una primera etapa de activación que requiere la unión del nucleótido, y por lo tanto no requiere la presencia de Mg^{2+} , su duración depende de la concentración de proteína; una segunda etapa catalítica que requiere Mg^{2+} (de Boer, Crossley et al. 1992).

4.2. POLÍMEROS DE FtsZ *IN VITRO*.

Recientemente se ha demostrado que FtsZ ensambla *in vitro* en dos tipos de formas poliméricas

Formación de tubos.

Se ha descrito la polimerización de FtsZ en estructuras tubulares *in vitro* (Bramhill y Thompson 1994). La polimerización es dependiente de GTP y Mg^{2+} . Ni el dGTP ni el ATP sustituyen al GTP. GDP y GTP- γ S se unen a FtsZ pero en su presencia no se produce polimerización (de Boer, Crossley et al. 1992; RayChaudhuri y Park 1992). Como la polimerización se realiza en presencia de potasio, presumiblemente el GTP se hidroliza. La formación de tubos se caracteriza por ser muy rápida, el plató se alcanza en ~2 segundos, siendo la velocidad inicial de polimerización mucho más rápida que la descrita para la polimerización de tubulina. El inicio de la polimerización no presenta retardo.

Estos polímeros parecen ser estructuras tubulares huecas de ca. 15-17 nm de diámetro y ca. 20 μ m de longitud. A partir de tinción negativa con acetato de uranilo se observan estriaciones paralelas longitudinales. Las subunidades parecen ser esféricas de ca. 3.5 nm.

Formación de filamentos o protofilamentos.

En ausencia de GTP, FtsZ forma partículas de 5 a 15 nm, mayores de lo esperado para monómeros de FtsZ. Tras la incubación con GTP a 37° C se observa la presencia de fibras de longitud variable con un diámetro calculado de 7 nm. La formación de estos filamentos no parece requerir la hidrólisis del GTP ya que se observan estructuras similares en presencia de GTP- γ S. El mutante FtsZ2, que une GTP pero no lo hidroliza, mantiene la capacidad de polimerización. FtsZ3 es un mutante que no une GTP y no polimeriza

(Mukherjee y Lutkenhaus 1994).

Cuando FtsZ se incubaba a 37° C en presencia de DEAE dextrano y GTP o GDP se observa otro tipo de estructuras, filamentos o tubos, de ca. 18 nm de diámetro. La morfología de estos polímeros parece diferir de la observada por Bramhill y col. (Bramhill y Thompson 1994). No hay formación de filamentos en presencia de GMP ni ATP ya que estos nucleótidos no se unen a FtsZ (Mukherjee, Dai et al. 1993).

La presencia de estos dos tipos de filamentos indica un polimorfismo en el ensamblaje o bien los filamentos delgados de 7 nm, actúan como protofilamentos de los gruesos de 18 nm.

4.3. HOMOLOGÍA DE SECUENCIA ENTRE FTSZ Y TUBULINA.

En los estudios que describieron la unión e hidrólisis de GTP por FtsZ se indicó la presencia de una secuencia rica en Gly característica de familia de las tubulinas (de Boer, Crossley et al. 1992; RayChaudhuri y Park 1992; Mukherjee, Dai et al. 1993). Una comparación más exhaustiva de las secuencias ha demostrado semejanza significativa entre los 260 primeros residuos de las tubulinas y 220 residuos de FtsZ. Que la zona de similitud se limite a la región amino sugiere que esta parte contiene los motivos esenciales para la unión e hidrólisis del GTP (Mukherjee y Lutkenhaus 1994).

Destacan tres regiones de las secuencias de FtsZ que presentan homología con otras tantas de tubulina y con motivos que participan en la unión de nucleótido en proteínas que unen GTP o ATP (tabla 3).

Como se ha indicado la zona de mayor similitud de secuencia entre FtsZ y tubulina es la región rica en Gly, potencialmente implicada en la unión del fosfato o la regulación del acceso de GTP en tubulina, por similitud con proteínas que unen ATP. La secuencia consenso en tubulina es (G/A)GGTGSG y la correspondiente en FtsZ es GGGTGTG, observándose sólo el cambio conservativo de Ser por Thr. El mutante FtsZ84 en el que la Gly105, primera del motivo, es sustituida por Ser, se caracteriza por carecer de actividad GTPasa (de Boer, Crossley et al. 1992; RayChaudhuri y Park 1992). Significativamente este mutante presenta actividad ATPasa dependiente de Mg^{2+} . La afinidad por el ATP y su

cinética de hidrólisis son menores que las observadas en la forma silvestre con el GTP. Es un caso único de conversión de GTPasa en ATPasa por una mutación puntual (RayChaudhuri y Park 1994). En el mutante FtsZ3 la Thr108, en el centro del motivo, se ha sustituido por Ala. Esta mutación reduce la unión del GTP y prácticamente abole la hidrólisis del GTP (Mukherjee, Dai et al. 1993; Dai, Mukherjee et al. 1994).

La región 66-72 de FtsZ de *E. coli*, KGLGAGA, se considera homóloga a la secuencia KGHYTEG de β -tubulina. Ambas se identifican con el motivo de unión de fosfatos α y β del nucleotido en proteínas que unen GTP, si bien presentan orientación inversa. Existen evidencias experimentales de la implicación de este motivo en la unión e hidrólisis de GTP en β -tubulina (ver antes).

Tabla 3. Regiones de FtsZ con homología con regiones de tubulina.

FtsZ		Tubulina		Homología con otras proteínas que unen nucleotido
Región ^a	Secuencia	Región ^b	Secuencia	
105-112	GGGTGTGA	140-146	(G/A)GGTG(S/A)G	Motivo de unión de fosfato o regulación de acceso del nucleotido en proteínas que unen ATP.
66-72	KGLGAGA	101-109	KGHYTEG	Motivo de unión de fosfato en proteínas que unen GTP.
208-212	VDFAD	220-224	PTYGD	Motivo de unión de Mg ²⁺ en proteínas que unen ATP.

^a Secuencia de FtsZ de *E. coli* (Yi y Lutkenhaus 1985).

^b Secuencia de β -tubulina de cerebro porcino (Kraus, Little et al. 1981).

La región 208-212 de FtsZ de *E. coli*, VDFDA, presenta homología con el motivo, "hidrofóbico-variable-aromático-variable-ácido", de unión de Mg^{2+} coordinado al nucleótido en proteínas que unen ATP. Este motivo también está presente en tubulinas. En el mutante FtsZ2 el Asp212 se sustituye por Gly. FtsZ2 une GTP pero no lo hidroliza. En FtsZ silvestre la unión de GTP no requiere Mg^{2+} , pero la hidrólisis sí. Por carecer de actividad GTPasa, se ha propuesto que FtsZ2 tiene alterada la capacidad de unión del catión, el cual presumiblemente interacciona con esta región a través de Asp212 (Dai, Mukherjee et al. 1994)

Objetivos

Determinación precisa de las zonas de las secuencias de α - y β -tubulina localizadas en la superficie del heterodímero $\alpha\beta$ y accesibles al ataque de proteasas.

Determinación de las zonas de la tubulina que se localizan en la superficie de los microtúbulos y de aquellas que estando expuestas en el heterodímero se ocuyen como consecuencia del ensamblaje.

Determinación de las zonas de la tubulina que se localizan en la superficie de las hojas inducidas por Zn^{2+} y de aquellas que no son accesibles a proteasas en estos polímeros.

Predicción de la estructura secundaria y supersecundaria de la tubulina a partir del análisis de las múltiples secuencias de tubulina descritas y su combinación con datos experimentales

Estudio de las posibles homologías estructurales entre tubulina y la proteína de división celular bacteriana FtsZ.

Materialles y métodos

1. Materiales.

- 1.1. Ligandos y productos químicos.
- 1.2. Tubulina: purificación y cuantificación.
- 1.3. Proteasas.
- 1.4. Inhibidores de proteasas.

2. Métodos.

- 2.1. Polimerización de microtúbulos de taxol y proteólisis limitada.
- 2.2. Polimerización de tubulina en hojas inducidas por Zn^{2+} y proteólisis limitada.
- 2.3. Monitorización de la polimerización: turbidez y medida de la concentración crítica.
- 2.4. Ultracentrifugación analítica: velocidad de sedimentación.
- 2.5. Microscopía electrónica.
- 2.6. Electroforésls.
- 2.7. Determinación del peso molecular aparente.
- 2.8. Transferencia.
- 2.9. Anticuerpos.
- 2.10. Inmunodetección.
- 2.11. Clasificación y nomenclatura de los fragmentos de tubulina.
- 2.12. Secuenciación.
- 2.13. Elucidación de los mapas peptídicos generados mediante proteólisis limitada.
- 2.14. Dicroísmo circular.
- 2.15. Determinación de la concentración de magnesio.
- 2.16. Estudios de secuencia y predicción de estructura.

1. MATERIALES.

1.1. LIGANDOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS.

La acrilamida, la N,N'-metilen-bis-acrilamida, el persulfato amónico y la N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamina fueron de Bio-Rad. La glicina, el MES, el SDS fueron de Sigma. El Sephadex G-25 y el DEAE Sephadex A-50 fueron de Pharmacia. El DTT y el GTP (sal dilitica) fueron de Boehringer Mannheim. El Tween-20 fue de Fluka. El cloruro de calcio, el cloruro de magnesio, el cloruro de zinc, el hidrógeno-fosfato sódico, el dihidrógeno-fosfato sódico, el glicerol, el DMSO, el β -mercapto-etanol, el metanol (grado para HPLC), el ácido tioglicólico y el acetato de uranilo fueron de calidad analítica de Merck. Todos los demás productos usados, salvo indicación expresa, fueron de Merck en grado analítico o mejor.

El Taxol¹ fue donado por el National Cancer Institute, N.I.H. (Bethesda, MD, EEUU).

1.2. TUBULINA: PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

La tubulina se purificó a partir de cerebro de choto por el procedimiento de Weisenberg modificado (Weisenberg, Borisy et al. 1968; Lee, Frigon et al. 1973; Andreu y Timasheff 1982) y se almacenó en nitrógeno líquido. Las concentraciones de tubulina se determinaron espectrofotométricamente en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 empleando el siguiente coeficiente de extinción en tampón 10 mM fosfato, 0.5% SDS, pH 7.0 $E_{274nm} = 1.07 \text{ l. g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Andreu, Gorbunoff et al. 1984). Las concentraciones muy bajas de tubulina se midieron espectrofluorimétricamente en tampón 10 mM fosfato, pH 7.0, empleando un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540, se excitó a 280 nm (anchura de banda 5 nm) y la emisión se midió a 320 nm (anchura de banda 10 nm), se calibró con soluciones patrón de tubulina de concentración conocida.

¹ La palabra "Taxol" es una marca registrada de Bristol-Myers Squibb, que ofrece a cambio el término paclitaxel. Ver "Names for hi-jacking" Nature 373:370 (1995)

1.3. PROTEASAS

La tripsina tipo XIII tratada con TPCK (Lote N° 100H8130), la α -quimotripsina tipo VII tratada con TLCK (Lote N° 92F8045), la clostripaina (Lote N° 47F0429), la termolisina tipo X (Lote N° 43F-0248) y la subtilisina (Carlsberg) tipo VIII (Lote N° 54F-0230) fueron de Sigma. La elastasa de páncreas bovino (Lote N° 12573721-11), la endoproteinasa Lys-C (Lotes N° 12291929-22 y N° 12483825-24), la proteinasa K (Lote N° 14241922-51) y la endoproteinasa Asp-N grado de secuenciación (Lote N° 14168324-21) fueron de Boehringer Mannheim. La proteasa V8 (de *Staphylococcus aureus*) (Lote N° 0301) fue de ICN, la bromelaina (Lote N° 013790) fue de Calbiochem y la papaína (látex seco) fue de Koch-Light Laboratories. Las características de las proteasas empleadas se indican en la tabla 4.

La clostripaina se disolvió en tampón 10 mM NaPi, 1 mM CaCl_2 , 2.5 mM DTT, pH 7.0, a una concentración de 1 mg/ml, y se activó durante 2 horas a 25° C.

La endoproteinasa Lys-C se disolvió a una actividad de 20 U/ml en tampón 10 mM NaPi, pH 7.0.

La termolisina se disolvió a 1 mg/ml en tampón 10 mM NaPi, 2 mM CaCl_2 , pH 7.0.

La papaína se preparó disolviendo 1 mg/ml de látex seco en tampón 10 mM NaPi, pH 7.0, y se clarificó mediante centrifugación.

La endoproteinasa Asp-N grado de secuenciación se resuspendió según las indicaciones del fabricante obteniendo una solución 0.04 mg/ml en tampón 10 mM Tris-HCl, pH 7.5.

El resto de las proteasas se prepararon por disolución a 1 mg/ml en tampón 10 mM NaPi, pH 7.0. Todas las soluciones así preparadas se guardaron a -20° C hasta su uso y se descartaron una vez descongeladas, excepto para las endoproteinasas Lys-C y Asp-N.

1.4. INHIBIDORES DE PROTEASAS

El PMSF fue de Calbiochem y la iodoacetamida y el EDTA fue de Sigma.

Se ha empleado 2 mM PMSF para las proteasas: tripsina, quimotripsina, elastasa, subtilisina, V8, papaína, endoproteinasa Lys-C y proteinasa K. 2 mM Iodoacetamida para clostripaina y bromelaina. 2 mM EDTA para la termolisina y la endoproteinasa Asp-N.

Tabla 4. Proteasas empleadas en los estudios de proteólisis limitada de tubulina.

PROTEASA	COD	TIPO	ESPECIFICIDAD PRIMARIA -P1-P1'-		pH OPTIMO	PM (kD)
			P1	P1'		
TRIPSINA EC 3.4.24.2	TR	Serin	Lys Arg	No específico	8.5 - 8.8	23.5
QUIMOTRIPSINA EC 3.4.21.1	CH	Serin	Trp Tyr Phe	No específico	7.5 - 8.5	25.0
ELASTASA EC 3.4.21.36	EL	Serin	Sin carga, No aromaticos eg Ala, Val, Leu, Ile, Gly, Ser	No específico	7.8 - 8.5	25.9
CLOSTRIPAINA EC 3.4.22.8	CL	Cistein	Arg	Pro preferido	7.1 - 7.6	
ENDOPROTEINASA LYS-C EC 3.4.99.30	LC	Serin	Lys	No específico	8.5	30.0
PAPAINA EC 3.4.22.2	PA	Cistein	No específico Arg, Lys preferidos	No específico	6.0 - 7.0	23.0
SUBTILISINA EC 3.4.21.14	SB	Serin	No específico Neutros y ácidos preferidos	No específico	7.0 - 8.0	30.0
PROTEASA V8 EC 3.4.21.9	V8	Serin	Glu Asp	No específico		27.0

TERMOLISINA EC 3.4.24.2	TH	Zn-metalo	No específico	Leu Phe Ile Val Met Ala	70 - 90	37.5
ENDOPROTEINASA ASP-N	DN	Metallo	No específico	Asp Acido aspartico	60 - 80	27.0
PROTEINASA K EC 3.4.21.14	PK	Senn	No específico. Aromático o Hidrofóbico preferido		75 - 120	28.8
BROMELANINA EC 3.4.22.4	BR	Cistein	No específico Lys, Arg, Tyr preferidos	No específico	60	33.0

2. MÉTODOS.

2.1. POLIMERIZACIÓN DE MICROTUBULOS DE TAXOL Y PROTEOLÍISIS LIMITADA

La tubulina se equilibro en tampón 10 mM NaPi, 0.1 mM GTP, pH 7.0, en una columna de Sephadex G-25 (20 x 0.9 cms). A las fracciones con proteína se les añadió 6 mM $MgCl_2$, pH final 6.7, y se centrifugaron en un rotor Ty65 (Beckman) a 39k rpm ($100.000 \times g$) a $4^\circ C$ durante 30 minutos, para eliminar agregados. Se tomó el sobrenadante, se ajustó la concentración de tubulina (c.a. 2 mg/ml) y se añadió GTP hasta una concentración final 1 mM

Para obtener microtúbulos se añadió en frío una cantidad de taxol aproximadamente equimolecular a la de tubulina (20×10^{-6} M), a partir de soluciones c.a. 5×10^{-3} M de taxol disuelto en DMSO. La concentración final de DMSO fue menor del 0.5% (v/v). A los controles de tubulina no ensamblada se añadió una cantidad igual de DMSO. Las muestras se calentaron a $37^\circ C$ durante 30 minutos, para inducir la polimerización en las muestras con taxol. A continuación se digirieron con las distintas proteasas a $25^\circ C$ durante 20 minutos. La reacción se detuvo añadiendo un exceso de inhibidor, y un volumen igual de tampón de muestra de electroforesis, y las muestras se hirvieron durante 3 minutos.

Se incluyeron controles de tubulina, no ensamblada y ensamblada, en ausencia de proteasas para verificar la estabilidad de la proteína durante el experimento.

2.2. POLIMERIZACIÓN DE TUBULINA EN HOJAS INDUCIDAS POR Zn^{2+} Y PROTEOLÍISIS LIMITADA

Los polímeros laminares de tubulina inducidos por Zn^{2+} en ausencia de glicerol ("hojas de tubulina- Zn ") se obtuvieron según se ha descrito (Arévalo, Nieto et al. 1990) con modificaciones. La tubulina se equilibró en tampón 100 mM MES, 0.1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM GTP, pH 6.5 (NaOH) por medio de una columna de Sephadex G-25 (25x0.9 cms) a $4^\circ C$. Las

fracciones con proteína se centrifugaron en un rotor Ty65 (Beckman) a 39k rpm (100.000 x g) a 4° C durante 20 min, para eliminar agregados. Se recuperó el sobrenadante, se ajustó la concentración de proteína a c.a. 2.0 mg/ml y se añadió GTP hasta 1 mM. La formación de polímeros laminares se indujo añadiendo 0.3 mM ZnCl₂ y calentando a 37° C.

Para obtener hojas de tubulina-Zn-glicerol se incluyó en el tampón 3.4 M glicerol. Cuando se deseó evitar la polimerización de la tubulina en presencia de Zn²⁺ se equilibró en tampón 10 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl₂, 0.1 mM GTP, pH 6.5 (NaOH).

La proteólisis limitada de estos polímeros se efectuó de igual forma que la de los microtubulos inducidos por taxol (ver antes).

2.3. MONITORIZACIÓN DE LA POLIMERIZACIÓN: TURBIDEZ Y MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA.

El ensamblaje de la tubulina en microtúbulos inducidos por taxol y en hojas inducidas por Zn²⁺-glicerol se monitorizó turbidimétricamente a 350 nm en un espectrofotómetro Varian 635. Se usó una cubeta de 10 mm de paso óptico termostatzada a la temperatura deseada con un baño Lauda RC6 y un baño Haake D8GH.

La medida de la concentración crítica del ensamblaje de estos polímeros se realizó por cuantificación de la masa de polímero formado. Las muestras, con concentraciones crecientes de tubulina, se polimerizaron durante 1 hora a 37° C. Se centrifugaron durante 10 min a 50k rpm (100.000 x g) en un rotor TLA-100 preequilibrado a 37° C. La concentración de tubulina en el sobrenadante, medida espectrofotométricamente o fluorimétricamente, corresponde a la concentración crítica de polimerización (Oosawa y Asakura 1975). Los precipitados se resuspendieron en un volumen de SDS 1%, NaPi 10 mM, pH 7.0, igual al inicial y se midió la concentración de tubulina espectrofotométricamente, que corresponde a la forma polimerizada. La representación de la concentración de la forma polimerizada frente a la concentración total de proteína es lineal en el rango del ensayo, y el punto corte con el eje de abscisas corresponde al valor de concentración crítica.

2.4. ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA: VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN.

El análisis de velocidad de sedimentación de las muestras de tubulina no polimerizada se realizó en una ultracentrífuga analítica Optima XL-A (Beckman), usando celdas de doble sector de 12 mm de paso óptico y ventanas de cuarzo, a una velocidad de 60000 rpm y una temperatura de 25° C para las muestras en tampón fosfato. Alternativamente estas muestras se preincubaron durante 30 min a 37° C. Los experimentos de tubulina en presencia de Zn^{2+} en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM GTP, pH 6.5 se realizaron a 8° C, con el fin de prevenir la formación de hojas inducidas por Zn^{2+} . En todos los casos la concentración de tubulina fue de ca. 2 mg/ml y se midió la absorbancia a 295 nm.

Los coeficientes de sedimentación se determinaron por el método del segundo momento, empleando el programa ORIGIN suministrado por Beckman (Laue, Shah et al. 1993)

Los coeficientes de sedimentación se corrigieron a condiciones de referencia (agua, 20° C; ver (van Holde 1985)) empleando un valor de $\bar{v} = 0.736$ (Lee y Timasheff 1974), y se corrigieron a dilución infinita empleando la siguiente relación (Schachman 1959), usando como valor de $g = 0.018$ ml/mg (Frigon y Timasheff 1975):

$$s = s^0 (1 - g \bar{v})$$

2.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Las muestras se adsorbieron durante 30 segundos sobre rejillas de cobre recubiertas con Formvar y carbón. Se tiñeron con una solución acuosa al 2% de acetato de uranilo durante 2 minutos y se secaron a temperatura ambiente. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico Philips EM 300 o EM 420.

2.6. ELECTROFORESIS.

La electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) se realizó de acuerdo con Laemmli (Laemmli 1970) con modificaciones que permiten la separación de α y β -tubulina (Best, Warr et al. 1981). Los geles de 160 x 160 x 1.5 mm fueron: el gel separador fue habitualmente del 10% de acrilamida en tampón 0.38 M Tris-HCl pH 9 con 0.1% SDS y 4 μ M β -mercapto-etanol; el gel concentrador fue del 5% de acrilamida en tampón 0.12 M Tris-HCl pH 6.8 con 0.1% SDS. El SDS usado era de Sigma, que contiene según especificaciones: 68% de sulfato de laurilo, 27% de sulfato de miristilo y 5% de sulfato de cetilo. El tampón de electroforesis fue 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS, 4 mM β -mercapto-etanol, pH 8.5. Las electroforesis se realizaron a 4° C y a intensidad constante: 18 mA para el gel concentrador y 36-40 mA para el gel separador.

Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul coomassie R de Serva al 1% en 45% metanol - 10% ácido acético.

Cuando se empleó la electroforesis para purificar péptidos para su posterior microsecuenciación, ocasionalmente se incluyó 2×10^{-6} M de ácido tioglicólico en el tampón de electroforesis. De esta forma se previene el bloqueo del extremo amino de las proteínas (Choli y Wittmann-Liebold 1990), sin alterar la movilidad electroforética de las bandas (datos no presentados).

2.7. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR APARENTE.

Para la determinación del peso molecular aparente en electroforesis (SDS-PAGE) de los fragmentos de proteólisis limitada de tubulina se emplearon patrones de peso molecular de Bio-Rad que contienen: fosforilasa b (PM 97400), BSA (PM 66200), ovoalbúmina (PM 45000), anhidrasa carbónica (PM 31000), inhibidor de tripsina (PM 21500) y lisozima (PM 14400).

La relación entre el peso molecular aparente (PMap) y la movilidad electroforética relativa (Rf) es:

$$\log (\text{PMap}) = a \times Rf + b$$

Se deduce que la relación entre el error en el cálculo del PMap (ΔPMap) y el error en el Rf (ΔRf) es función lineal del PMap del fragmento:

$$\Delta\text{PMap} = \text{PMap} \times (1 - 10^{a \times \Delta Rf})$$

El valor medio observado del parámetro "a" es -0.010303 ± 0.000292 . En la figura 3 se representa el error en la determinación del PM aparente en función del PM aparente del fragmento.

Se ha determinado la relación entre el peso molecular teórico de los fragmentos conocidos y su peso molecular aparente. Se han definido cuatro grupos de fragmentos: fragmentos de α -tubulina que conservan el extremo amino, fragmentos de α -tubulina que conservan el extremo carboxilo, fragmentos de β -tubulina que conservan el extremo amino y fragmentos de β -tubulina que conservan el extremo carboxilo. La distinción entre los dos tipos de tubulinas tiene en cuenta la diferencia de movilidad electroforética entre α -tubulina (PMap c.a. 60 kD) y β -tubulina (PMap c.a. 55 kD). La distinción entre fragmentos que conservan el extremo amino o el carboxilo refleja la influencia en la movilidad electroforética de la diferencia en la naturaleza del extremo amino, marcadamente hidrofóbico, y el extremo carboxilo, marcadamente polar con abundancia de cargas negativas. Se ha supuesto una relación lineal entre el peso molecular teórico, calculado a partir de la secuencia, y el peso molecular aparente (Figura 4).

Por interpolación del peso molecular aparente de los fragmentos no definidos se ha calculado el peso molecular aparente corregido (PM_{cor}).

2.8. TRANSFERENCIA.

La tubulina y los fragmentos producidos en las proteólisis limitadas separados en SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa de 0.2 μm (Bio-Rad) para inmunodetección o a membranas Immobilon-P³⁰ (Millipore) de difluoruro de

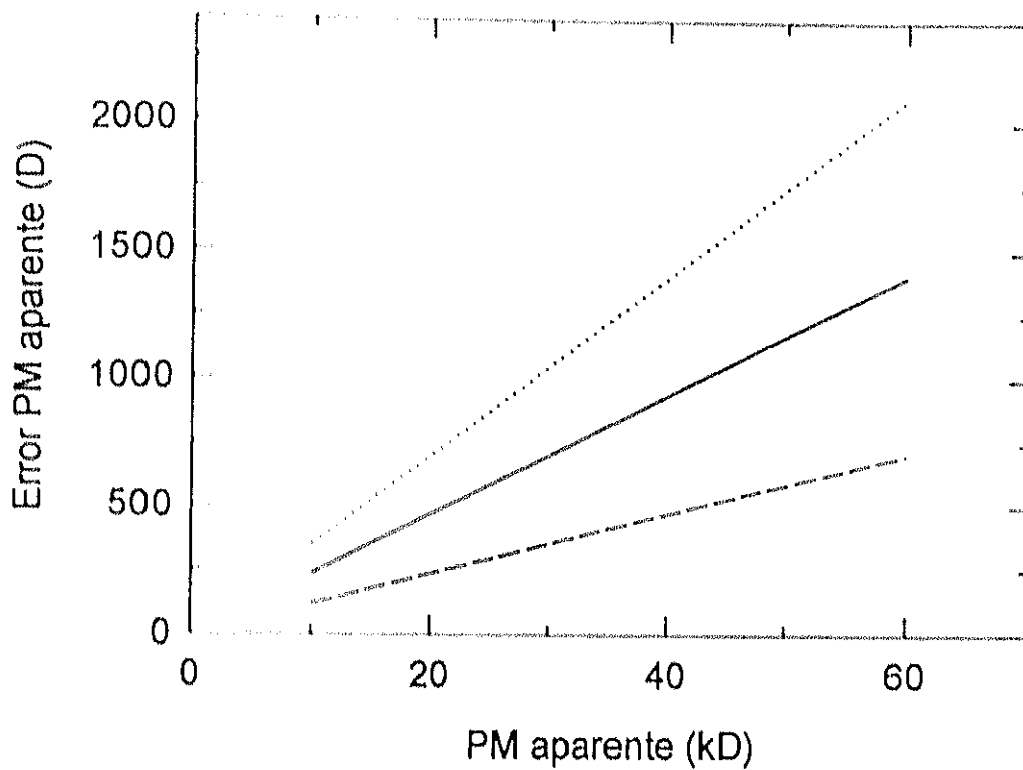


Figura 3. Representación del error en la determinación del peso molecular aparente, en función del peso molecular aparente, asociado a tres valores de error en la movilidad electroforética relativa: 0.5% (línea de trazo discontinuo), 1.0% (línea de trazo continuo) y 1.5% (línea de puntos).

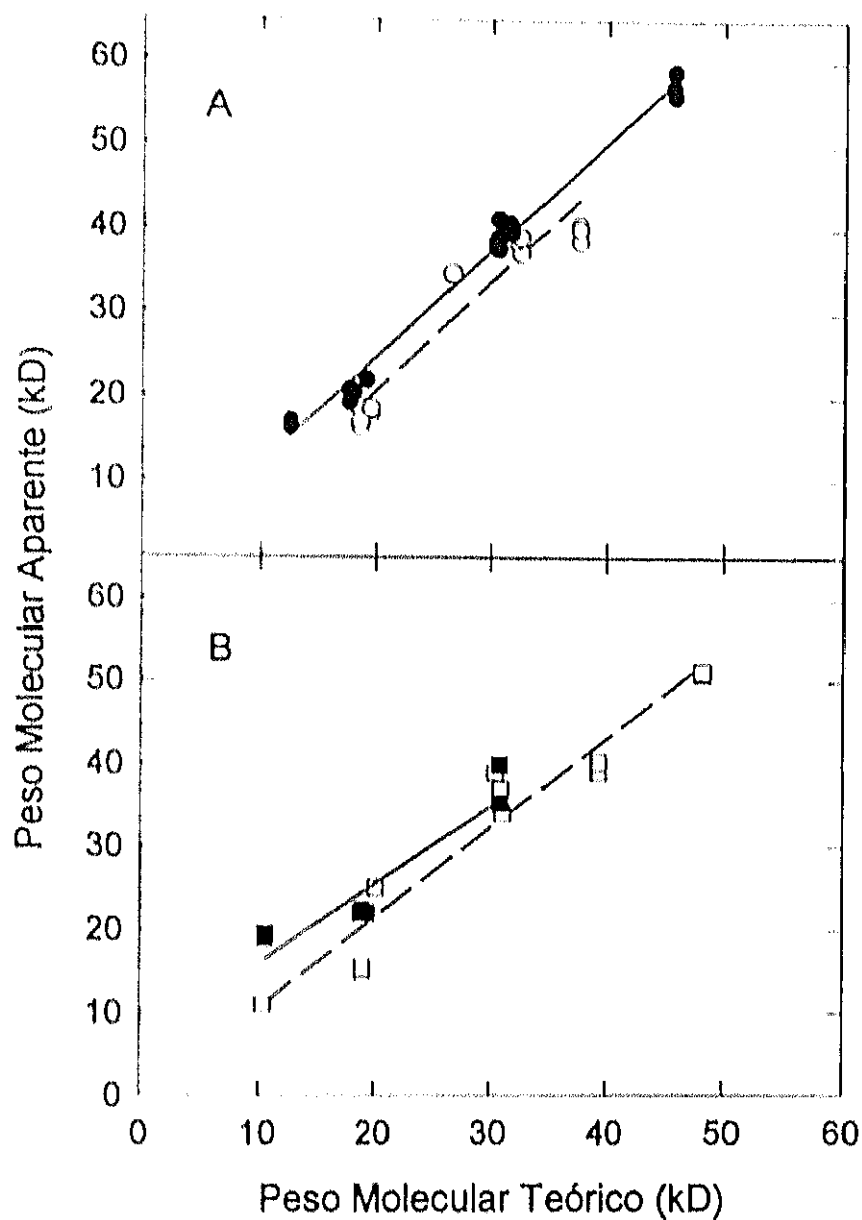


Figura 4. Relación entre pesos moleculares teóricos y pesos moleculares aparentes observados en electroforesis. (Panel A) fragmentos de α -tubulina: (○, línea trazo discontinuo) fragmentos de α -tubulina que conservan el extremo amino, incluido el fragmento LC α 3; (●, línea de trazo continuo) fragmentos de α -tubulina que conservan el extremo carboxilo. (Panel B) fragmentos de β -tubulina: (□, línea de trazo discontinuo) fragmentos de β -tubulina que conservan el extremo amino, incluido BR β 4; (■, línea de trazo continuo) fragmentos de β -tubulina que conservan el extremo carboxilo. Las líneas corresponden a la regresión lineal de los datos.

polivinilideno (PVDF) para secuenciación.

Se empleó un sistema de electrotransferencia semi-seco Trans-Blot SD de Bio-Rad, con ánodo de titanio recubierto con platino y cátodo de acero inoxidable. Se usó como tampón de transferencia 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8.5. Los geles se equilibraron durante 30 minutos en el tampón de transferencia. Entre el ánodo y el cátodo se dispusieron por el siguiente orden: 5 hojas de papel Whatman 3 MM Chr, la membrana de nitrocelulosa o Immobilon P^{sq}, el gel de acrilamida y 7 hojas de papel Whatman 3 MM Chr. La transferencia se efectuó a voltaje constante, 15 voltios, durante 1.3 horas cuando se usaron membranas de nitrocelulosa y 1.5 horas cuando se empleó Immobilon-P^{sq}.

Las membranas de nitrocelulosa se secaron y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso. Las membranas de PVDF Immobilon-P^{sq} se lavaron 5 minutos en agua, se tiñeron las proteínas durante 5 minutos con 0.1% azul coomassie R (Serva) en 50% metanol, el exceso de colorante se eliminó durante 10-15 minutos con 50% metanol, 10% acético, se lavaron las membranas 5-10 minutos con agua, se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron a -20° C hasta su uso (Matsudaira 1987).

2.9. ANTICUERPOS.

2.9.1. ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los anticuerpos monoclonales 6-11B-1, frente a α -tubulina acetilada (LeDizet y Piperno 1987), y 1A2, frente a la α -tubulina tirosinada en el extremo carboxilo (Kreis 1987) fueron de Sigma. El anticuerpo 6-11B-1 reconoce específicamente la α -tubulina acetilada post-traduccionalmente en Lys40. Une específicamente el péptido QMPSDKTIGG, homólogo de la posiciones 35-44 de α -tubulina, sólo cuando se acetila químicamente con anhídrido acético (LeDizet y Piperno 1991).

Se ha empleado el anticuerpo monoclonal P₁₁E₁₂C₃, que reconoce específicamente la secuencia 1-13 correspondiente a la β -tubulina de cerebro porcino (de Inés 1995).

2.9.2. ANTICUERPOS MONOESPECÍFICOS.

Se han empleado anticuerpos policlonales, producidos con anterioridad en el laboratorio, específicos frente a los siguientes epítopos: α (415-443), β (153-165), β (241-256) y β (412-431) (Andreu, de la Viña et al. 1988; de la Viña, Andreu et al. 1988; Arévalo, Nieto et al. 1990).

2.9.3. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOESPECÍFICOS.

Ha sido necesario volver a producir anticuerpos frente a los epítopos α (155-168) y α (214-226) según el protocolo descrito por Andreu et al. (Andreu, de la Viña et al. 1988).

Los péptidos ERLSVDYGKKSKLEC y RRNLDIRPTYTN que son homólogos con las posiciones 155-168 y 214-226 de α -tubulina de cerebro porcino respectivamente, fueron sintetizados en fase sólida, se purificaron y se analizaron según se ha descrito (Andreu, de la Viña et al. 1988; Arévalo, Nieto et al. 1990).

El péptido correspondiente a la región α (155-168) se conjugó a KLH (Calbiochem) empleando el éster m-maleimido-benzoyl-N-hydroxysuccinimida (MBS) (Pierce), este reactivo bifuncional enlaza grupos amino con grupos sulfhidrilo (Liu, Zinnecker et al. 1979 ; Green, Alexander et al. 1982 ; Arévalo, Nieto et al. 1990). El péptido correspondiente a la región α (214-226) se conjugó a BSA libre de ácidos grasos (Sigma) empleando glutaraldehído (grado para microscopía electrónica, Merck) que reacciona preferentemente con grupos amino (Kagan y Glick 1979). La relación obtenida entre el péptido α (214-226) y la proteína transportadora fue 0.073 g péptido / g BSA.

Se inmunizaron conejos de Nueva Zelanda mediante inyección intradérmica de 1 ml de aceite adyuvante Freund completo (Difco) que contenía ca. 0.47 mg de α (155-168)-KLH y ca. 0.61 mg α (214-226)-BSA respectivamente. Los animales fueron reinyectados a las 2, 4 y 8 semanas con iguales cantidades de cada antígeno emulsificadas en aceite adyuvante Freund incompleto (Difco). Se fue obteniendo suero de los animales a intervalos regulares a partir de sangrados en la oreja y finalmente mediante punción cardíaca (Andreu, de la Viña et al. 1988).

Se obtuvieron los sueros NC55 y NC56 de los conejos inmunizados con el péptido $\alpha(155-168)$, y los sueros NC38 y NC39 de los inmunizados con el péptido $\alpha(214-226)$. Se ensayó la reactividad cruzada de estos sueros frente a tubulina de cerebro bovino mediante ELISA directo (ver abajo). En la figura 5 se muestran curvas de ELISA representativas. El suero NC39 presentó un título antitubulina significativo en el suero preinmune y no se detectó una producción específica tras la inmunización. En posteriores ensayos para el epítipo $\alpha(214-226)$ se empleó exclusivamente el suero NC38. Los sueros reaccionaron específicamente con la banda de α -tubulina transferida a membranas de nitrocelulosa. En la tabla 5 se resumen las características de estos sueros.

Tabla 5. Sueros anti-péptidos de tubulina.

Suero	Péptido	Tipo de conjugado y transportador	Título recíproco ^a Anti-tubulina	Inmunodetección en membrana ^b
NC55	$\alpha(155-168)$	MBS-KLH	160	+
NC56	$\alpha(155-168)$	MBS-KLH	160	+
NC38	$\alpha(214-226)$	Glutaraldehído-BSA	450	+
NC39	$\alpha(214-226)$	Glutaraldehído-BSA	n.d.	n.d.

^a Título arbitrario que corresponde a la dilución del suero que da una absorbancia en ELISA de la mitad de la absorción máxima.

^b Reactividad específica con la cadena de α -tubulina.

El título anti-tubulina de los sueros se monitorizó mediante ELISA directo. Se emplearon placas Costar de 96 pocillos recubierto cada uno con ca. 4 μ g de tubulina en tampón PBS, 1mM EGTA, 0.1mM GTP, 1mM $MgCl_2$, durante 12-15 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS 0.075% Tween-20 y dos veces con agua destilada. Los sitios de unión inespecíficos de las placas se saturaron con gelatina (Difco) al 1% (p/v) en PBS, durante 12-15 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS 0.05% gelatina y dos veces con agua destilada. Las diluciones de los sueros, en

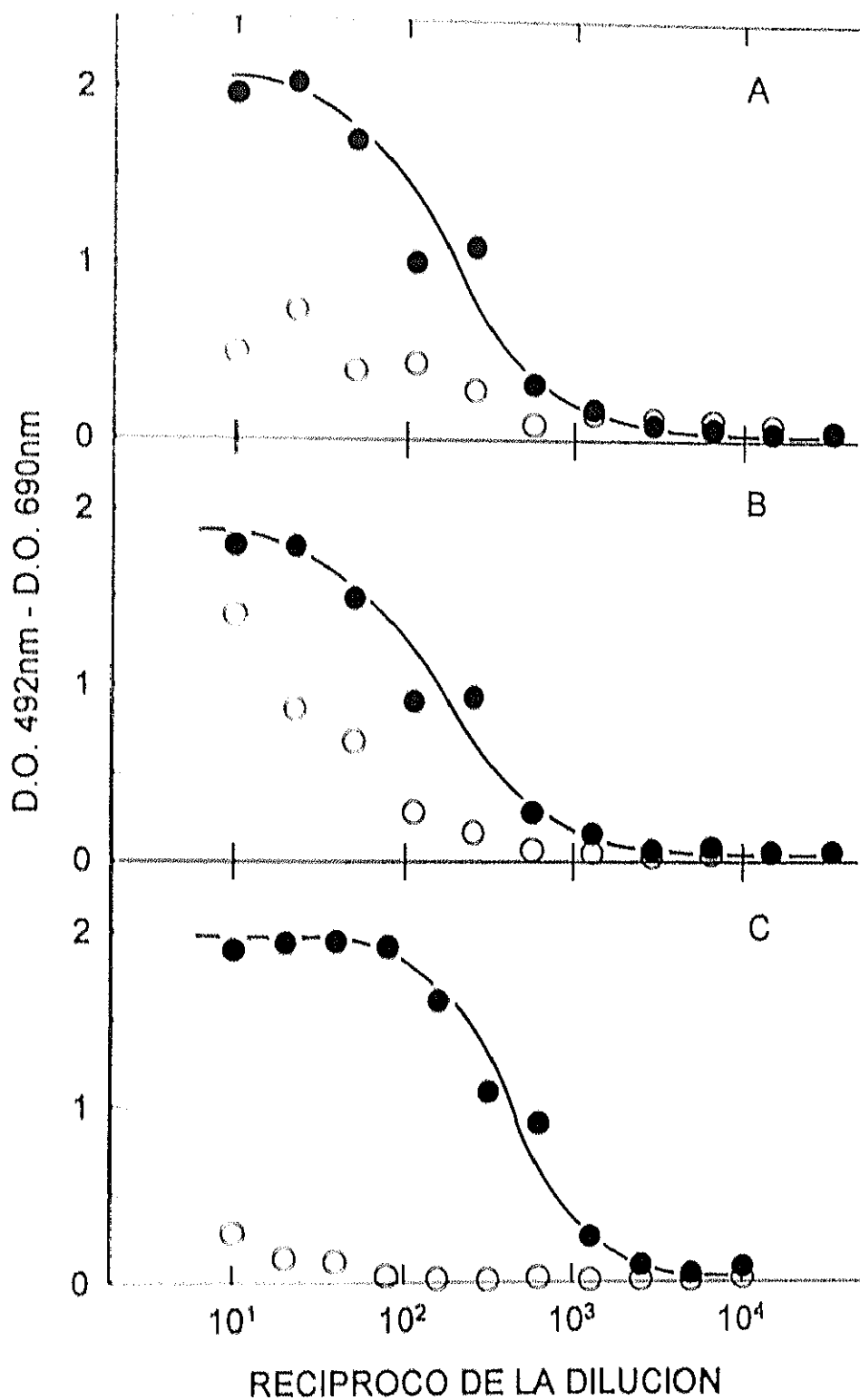


Figura 5. ELISA frente a tubulina de sueros anti-péptidos. (Panel A) Suero NC55 anti- $\alpha(155-168)$. (Panel B) Suero NC56 anti- $\alpha(155-168)$. (Panel C) Suero NC38 anti- $\alpha(214-226)$. (○ y líneas discontinuas) sueros preinmunes, (● y líneas continuas) sueros inmunes obtenidos por punción cardiaca.

tampón PBS 0.05% gelatina, se incubaron durante 1.5 horas a 37° C. Las placas se lavaron tres veces con PBS 0.075% Tween-20 y dos veces con agua destilada. Para determinar la presencia de anticuerpo se incubaron con proteína A conjugada con peroxidasa a una dilución 1/750 en PBS, 0.075% Tween-20, 0.05% gelatina, durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBS 0.075% Tween-20 y dos veces con agua destilada. Como sustrato de la reacción colorimétrica se emplearon 100 µl/pocillo de 0.4 mg/ml 1,2-phenyldiamina (OPD) en tampón 62.3 mM citrato, 25.5 mM Na₂HPO₄, pH 5.2, 0.04% H₂O₂. Tras 15 minutos la reacción se detuvo añadiendo 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 3N. La densidad óptica, DO_{422nm}-DO_{630nm} o DO_{450nm}-DO_{620nm}, en cada pocillo se midió con un lector de placas Titertek Multiscan. Se consideró arbitrariamente como título el inverso de la dilución del suero que rindió un señal igual a la mitad de la señal máxima observada.

Tabla 6. Anticuerpos empleados en la interpretación de mapas peptídicos de tubulina.

Nombre	Tipo	Epítopo ^a	Dilución ^b
6-11 B-1	monoclonal	α ⁴⁰ K-Acetilada	1/10.000
NC35	policlonal	α (155-168)	1/6.000 - 1/8000
NC38	policlonal	α (214-226)	1/10.000
C102	policlonal	α (415-443)	1/2.000 - 1/4.000
1A2	monoclonal	α Tb tirosinada	1/10.000
P ₁₁ E ₁₂ C ₁	monoclonal	β (1-13)	1/50.000
C140	policlonal	β (153-165)	1/80.000 - 1/100.000
C99	policlonal	β (241-256)	1/1.600 - 1/2.000
C106	policlonal	β (412-431)	1/4.000 - 1/6.000

^a Todos los anticuerpos tienen especificidad de cadena y de secuencia.

^b Diluciones empleadas para la inmunodetección de fragmentos de tubulina sobre membranas de nitrocelulosa.

2.10. INMUNODETECCIÓN.

La inmunodetección de los mapas peptídicos de la tubulina se realizó según Andreu et al (Andreu, de la Viña et al. 1988) con modificaciones.

Cuando se emplearon sueros de anticuerpos policlonales monoespecíficos las membranas de nitrocelulosa conteniendo los mapas peptídicos de tubulina se incubaron con 1% gelatina en tampón fosfato salino pH 7.2 (PBS) durante 12-15 horas, con agitación constante a temperatura ambiente, para evitar la posterior adsorción inespecífica de los anticuerpos. Se lavaron brevemente con tampón PBS - 0.05% Tween 20. Se incubaron durante 2 horas con los sueros respectivos a las diluciones adecuadas (tabla 6) en tampón PBS, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA (Sigma). Se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS, 0.05% Tween y se incubaron durante 90 minutos con anticuerpo de ratón frente a IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Bio-Rad), diluido 1/10000 en PBS, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA. Se lavaron 4 veces durante 5 minutos con PBS, 0.05% Tween 20 y 2 veces con PBS. Se escurrieron las membranas, se incubaron durante 1 minuto con los reactivos del sistema de detección quimioluminiscente (ECL) de Amersham, se eliminó el exceso de reactivo y se envolvieron las membranas en plástico. Dentro de los 30 minutos siguientes se impresionaron películas X-Omat S (Kodak) durante 20 segundos a 3 minutos.

Cuando se emplearon anticuerpos monoclonales el tampón PBS se sustituyó por tampón Tris-HCl salino pH 7.4 (TBS), la incubación del anticuerpo primario se limitó a 90 minutos y la del secundario a 1 hora, y como anticuerpo secundario se empleó anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Bio-Rad) en una dilución 1/10000.

2.11. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA DE LOS FRAGMENTOS DE TUBULINA.

Se han clasificado independientemente los fragmentos de α - y de β -tubulina, ya que el empleo de anticuerpos específicos permite el análisis independiente de ambas cadenas. La clasificación se ha efectuado a partir del análisis mediante anticuerpos de los mapas peptídicos generados. De forma general el nombre asignado a cada fragmento consta de 3

partes. Primero se indica la proteasa que lo genera, mediante una o dos letras mayúsculas abreviatura del nombre de la proteasa (tabla 4). En segundo término se indica la cadena de α - o β -tubulina a la que pertenecen. Por último se numeran en orden decreciente de valor de peso molecular aparente, para cada proteasa hay una serie de fragmentos de α - y otra de β -tubulina.

Los fragmentos que se generan exclusivamente en la proteólisis limitada de tubulina ensamblada en microtúbulos de taxol se indican anteponiendo la abreviatura "TX". Los generados exclusivamente en presencia de Zn^{2+} se indican anteponiendo una "Z" al nombre. La numeración de estos fragmentos es independiente.

2.12. SECUENCIACIÓN.

La secuenciación del extremo amino de los fragmentos peptídicos separados por electroforesis y transferidos a Immobilon-P^{3Q} se realizó en un secuenciador Applied Biosystems modelo 477A equipado con un analizador de derivados de feniltiohidantoína (PTH) en línea.

Para localizar los puntos de corte que producen los fragmentos cuyo extremo amino se ha secuenciado, la secuencia obtenida experimentalmente se comparó con las secuencias de α - y β -tubulina de cerebro porcino (Kraus, Little et al. 1981; Ponstingl, Kraus et al. 1981). Una vez identificados inequívocamente los fragmentos se calculó su peso molecular teórico a partir de las secuencias anteriores. No se ha tenido en cuenta el aumento del peso molecular debido a las modificaciones post-traduccionales.

2.13. ELUCIDACIÓN DE LOS MAPAS PEPTÍDICOS GENERADOS MEDIANTE PROTEOLISIS LIMITADA.

La identificación de los fragmentos de tubulina producidos en la proteólisis limitada se ha realizado mediante tres métodos, según la información disponible de cada fragmento.

Los péptidos cuya secuencia amino terminal ha sido posible determinar, y cuando ésta

no correspondía al extremo amino de α - o β -tubulina se asignaron directamente.

Los fragmentos generados en los mismos cortes que los péptidos anteriores se asignaron en base a esta complementariedad.

En tercer lugar los fragmentos cuya secuencia amino terminal no ha sido posible determinar y no son complementarios de fragmentos identificados, se asignaron a partir de su tamaño y reactividad frente al panel de anticuerpos monoespecíficos empleados. Se determinó el peso molecular aparente corregido y tras fijar uno de los extremos del fragmento, amino o carboxilo, se calculó la extensión del fragmento que tiene igual peso molecular. Con el fin de obtener una asignación más realista no se empleó un valor de peso molecular de residuo promedio, si no que se tuvo en cuenta la secuencia de la cadena polipeptídica.

2.14. DICROISMO CIRCULAR

Las medidas de dicroísmo circular se realizaron en un dicrógrafo Jasco J-720 empleando una celda de cuarzo Helma de 0.1 mm de paso óptico termostatzada a la temperatura deseada. Los espectros se obtuvieron como media de 5 medidas consecutivas, el ancho de banda fue de 1 nm, la velocidad de barrido 20 nm min⁻¹ y el tiempo de respuesta 4 seg. Los espectros se representan en elipticidad molar por residuo medio la cual se calculó empleando un valor de peso molecular por residuo de 109 (Lee, Corfman et al. 1978).

2.15. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE MAGNESIO.

Las concentraciones totales de Mg²⁺ se midieron por absorción atómica (Martin y Shapiro 1988) en un espectrofotómetro Perkin Elmer 2380 equipado con una lámpara para Ca y Mg. Se midió la absorbancia a 285.2 nm (ancho de banda 0.7 nm). Como patrones se emplearon soluciones de MgCl₂ de concentración conocida.

2.16. ESTUDIOS DE SECUENCIA Y PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA.

2.16.1. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS.

Se emplearon las secuencias de α -, β -, γ -tubulinas y FtsZ disponibles en la base de datos SWISS-PROT (Bairoch y Boeckmann 1991). El alineamiento múltiple de estas secuencias se realizó con el programa MaxHom (Sander y Schneider 1991).

2.16.2. MÉTODO PHDsec DE PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA SECUNDARIA.

La predicción de estructura secundaria se realizó mediante el método PHDsec que implementa los algoritmos de Rost y Sander (Rost y Sander 1993; Rost y Sander 1994).

El diccionario de estructura secundaria de proteínas (Kabsch y Sander 1983) clasifica los elementos de estructura secundaria, obtenidos de datos estructurales de cristalografía y resonancia magnética nuclear de proteínas, en 8 tipos. El método PHDsec de predicción de estructura secundaria agrupa estos 8 tipos de elementos estructurales en 3 clases según la siguiente convención.

Hélice (α) o H: incluye las hélices α , hélices 3-10 y las hélices π .

Lámina extendida o E: incluye los segmentos de extendidos de lámina β , tanto en disposición paralela como antiparalela.

Bucles o L: incluye residuos en puentes β aislados, giros, vueltas y estructura desordenada.

El método PHDsec de predicción de estructura secundaria emplea un sistema basado en una red neuronal de 3 niveles.

Primer nivel o nivel "secuencia a secuencia". En este nivel se asigna a cada residuo una de las 3 estructuras (H, E o L). La información de entrada con la que trabaja este nivel es un alineamiento múltiple de secuencias. La predicción realizada sobre una única secuencia es menos exacta que otras predicciones basadas en métodos empíricos y estadísticos. El uso

de alineamientos múltiples de secuencia mejora la exactitud de la predicción entre un 6% a un 8%, significativamente por encima de otros métodos. La información evolutiva contenida en el alineamiento múltiple es extremadamente útil en la predicción de estructura secundaria. El método determina para cada posición la frecuencia de aparición de cada uno de los 20 aminoácidos. Estos 20 números constituyen la celda básica de introducción de datos. Este nivel trabaja con una ventana de 13 aminoácidos de la que se obtiene la predicción de estructura secundaria para la posición central. La ventana se va desplazando a lo largo de la secuencia. Se incluye un número adicional en la celda básica que contiene información sobre los residuos para los cuales la ventana se extiende fuera de los límites de la cadena.

La presencia de inserciones y deleciones en los alineamientos múltiples de secuencia ocurre con mayor frecuencia en bucles que en hélices y láminas. La frecuencia de aparición de inserciones y deleciones en una posición conlleva información sobre la estructura secundaria. Esta información se incluye en este primer nivel como 2 unidades más en la celda básica o vector. La introducción de esta información mejora la exactitud de la predicción de bucles del 72.3% al 76.9%. Otra consecuencia es la reducción de la tendencia a la sobreestimación de hélices y láminas.

Segundo nivel o nivel "estructura a estructura". Este nivel considera, al menos en parte, la correlación existente entre los patrones de predicción de estructura secundaria de los residuos adyacentes. Los datos de entrada para este segundo nivel vienen dados por una ventana de 17 celdas básicas. Cada celda básica codifica el resultado del nivel "secuencia a estructura" de cada posición. El resultado del segundo nivel es de nuevo el tipo de estructura secundaria del residuo central de la ventana considerada. El alineamiento múltiple de secuencias contiene información adicional, como el número de secuencias alineadas y la similitud de las mismas. El método considera esta información asignando un mayor peso específico a las posiciones más conservadas en los dos primeros niveles de la red neuronal. De esta forma se mejora un 0.5% la exactitud del método. En este nivel no se incluye la información sobre la frecuencia de inserciones y deleciones ya que reduce la exactitud de la predicción.

Con los dos primeros niveles de la red se obtiene una exactitud del 68% en la predicción.

Tercer nivel o "decisión del jurado". Cada forma de clasificación de los dos primeros niveles, o arquitecturas, está asociada con un error particular. La combinación de distintas arquitecturas produce una reducción de este ruido, lo que manifiesta que las diferentes arquitecturas no están completamente correlacionadas. Este nivel combina arquitecturas independientes, normalmente 10, calculando la media aritmética de las mismas (Si), según la expresión

$$\langle Si \rangle_{\text{Jurado}} = \frac{\sum_{n=1}^{\chi} Si^n}{\chi}$$

χ = H, E, L.

χ = número de arquitecturas.

Si^n = resultado de la arquitectura "n" para la posición "i".

Con este nivel se mejora un 2% la exactitud total del método.

PHDsec además de asignar un tipo de estructura a cada posición de la secuencia, indica la probabilidad de asignar cada una de las tres clases de estructura (H, E o L). También da información sobre la fiabilidad de la predicción en cada residuo. Define un índice "Rel", normalizado de 1 a 9, que refleja la diferencia de probabilidad entre los dos tipos de estructura más probable para una determinada posición.

En conjunto el método PHDsec tiene una exactitud del 70.8% en la asignación de estructura secundaria a residuos aislados, aplicado a proteínas globulares. La exactitud media para la predicción de una proteína es 72.2 ± 9.3 %. Supera en c.a. 4% la exactitud de cualquier otro método de predicción. Se ha estimado la exactitud en la asignación de cada uno de los 3 tipos de estructuras: hélices (H), lámina β (E) y bucles (L); a partir de los resultados de predicción de aproximadamente 250 proteínas de estructura conocida (tabla 7). Se definen dos valores de exactitud observada y predicha:

$$Q_i (\% \text{ observado}) = \frac{\text{N}^\circ \text{ de residuos correctamente predichos con estructura } i}{\text{N}^\circ \text{ total de residuos con estructura } i} \times 100$$

$$Q_i (\% \text{ predicho}) = \frac{\text{N}^\circ \text{ de residuos correctamente predichos con estructura } i}{\text{N}^\circ \text{ total de residuos predichos con estructura } i} \times 100$$

siendo $i = H, E, L$.

Tabla 7. Estimación de la exactitud de la predicción del método PHDsec.

Tipo de Estructura	Exactitud	
	Q % Observado	Q % Predicho
Hélice (H)	70 %	77 %
Lámina β (E)	62 %	64 %
Bucle (L)	79 %	72 %

Dentro de un grupo de proteínas que pertenezcan a la misma familia estructural existe una notable variación de la estructura secundaria de cada residuo. Para una clasificación en 3 tipos de estructura secundaria el valor medio de la diferencia es c.a. 12% con una desviación estándar c.a. 9%, comparable con la desviación estándar de varios métodos de predicción. Esta diferencia es una característica intrínseca de las familias de proteínas (Chothia y Lesk 1986). Como consecuencia el objetivo de los métodos de predicción no es obtener una exactitud del 100% en la asignación de estructura a nivel de residuo. Un objetivo más realista de la predicción a partir de un conjunto de secuencias análogas es lograr una exactitud c.a. 80%. No es razonable esperar una mejor precisión en la predicción que la variabilidad intrínseca observada entre proteínas de una familia (Russell y Barton 1993; Rost, Sander et al. 1994).

La estimación del contenido de estructura secundaria por PHDsec tiene un error

menor del 10% (8.5% para hélice y 8.1% para lámina β). Este parámetro se obtiene del valor medio de la diferencia entre el contenido de estructura secundaria asignada y el contenido real, en el conjunto de proteínas ensayadas. Los resultados son comparables a la estimación de estructura secundaria obtenidos por dicroísmo circular en determinados casos. La comparación es difícil ya que no existe un estudio del contenido de estructura secundaria por dicroísmo circular en un conjunto de proteínas similar al empleado en la comprobación de PHD. Además los resultados de dicroísmo circular suelen emplear 5 tipos de estructura secundaria: hélice, hojas antiparalelas, hojas paralelas, giros y lazos.

Las secuencias de α - y β - tubulina empleadas como guías en la predicción de estructura secundaria son las de cerebro porcino (Krauh, Little et al. 1981; Ponstingl, Krauh et al. 1981). Como secuencia guía de Ftsz se empleó la de *Escherichia coli* (Yi y Lutkenhaus 1985). Se accedió al método PHDsec mediante correo electrónico a la dirección de la red internet: *PredictProtein@EMBL-Heidelberg.DE*.

2.16.3. METODO PHDacc DE PREDICCIÓN DE ACCESIBILIDAD DEL SOLVENTE.

El concepto de accesibilidad del solvente fue introducido por Lee y Richards (Lee y Richards 1971). La información de accesibilidad del solvente a los residuos de una proteína es una proyección en una dimensión de cierta información de la estructura tridimensional. Su predicción ofrece información complementaria a la predicción de estructura secundaria. Esta propiedad está menos conservada que la estructura secundaria dentro de las familias de proteínas con homología en la estructura tridimensional, el coeficiente de correlación es de 0.77. La accesibilidad de residuos completamente ocultos está mejor conservada.

Se ha empleado el método de predicción de accesibilidad del solvente, PHDacc (Rost y Sander 1994) que emplea una red neuronal similar a la empleada por los mismos autores en el método PHD de predicción de estructura secundaria. PHDacc utiliza los siguientes parámetros:

Accesibilidad del solvente de un residuo (Acc), es la medida en \AA^2 de la superficie del aminoácido en contacto con moléculas del solvente.

Accesibilidad relativa del solvente de un residuo (RelAcc), es el cociente entre la accesibilidad del solvente de un residuo y la accesibilidad máxima para ese tipo de aminoácido. Permite la comparación entre aminoácidos de distinto tamaño.

A partir de estas estimaciones se definen 3 modelos de accesibilidad del solvente:

Modelo de 10 estados. Asigna a cada residuo un valor de accesibilidad relativa normalizado de 0 a 9 (RelAcc10), calculado como:

$$\text{RelAcc10} = \text{PARTE ENTERA } (100 \times \text{RelAcc})^{1/2}$$

El uso de la raíz cuadrada describe en mayor detalle los residuos ocultos que los expuestos.

Modelo de 2 estados. Clasifica los residuos en 2 tipos: ocultos (B) cuando $\text{RelAcc} < 16\%$ y expuestos (E) cuando $\text{RelAcc} \geq 16\%$.

Modelo de 3 estados. Clasifica los residuos en 3 tipos: ocultos (B) cuando $\text{RelAcc} < 9\%$, intermedio (I) cuando $\text{RelAcc} = 9-36\%$, y expuestos (E) cuando $\text{RelAcc} \geq 36\%$.

El método PHDacc mejora la exactitud de la predicción frente a métodos anteriores como los de Holbrook y col. (Holbrook, Muskall et al. 1990) y Wako y Blundell (Wako y Blundell 1994). Facilita una predicción de accesibilidad más detallada, ya que emplea un modelo de 10 estados. El coeficiente de correlación entre la predicción y la observación experimental es 0.54. En términos absolutos este valor es bajo, sin embargo debido a la baja conservación de la accesibilidad del solvente en las familias de proteínas con estructuras homólogas, el resultado de PHDacc no está alejado del óptimo esperado. La calidad de la predicción es mayor en los casos extremos: residuos totalmente ocultos o totalmente expuestos. Por ejemplo el 86% de los residuos completamente ocultos se predicen con 0% de accesibilidad del solvente.

Se accedió al método PHDacc mediante correo electrónico a la dirección de la red internet: *PredictProtein@EMBL-Heidelberg.DE*. Se emplearon las mismas secuencias que

para la predicción de estructura secundaria.

2.16.4. DETERMINACIÓN DEL MOMENTO HIDROFÓBICO.

El momento hidrofóbico es la hidrofobicidad de un péptido calculada para diferentes ángulos de rotación por residuo. Es una medida de la probabilidad de que un péptido en una determinada posición se localice en la interfase entre el interior y la superficie de la proteína, es decir que separe residuos hidrofóbicos e hidrofílicos en una estructura periódica (Eisenberg, Weiss et al. 1984).

El ángulo de rotación típico entre residuos de una hélice- α es de 100° . Un valor elevado del momento hidrofóbico en torno a este ángulo indica la presencia de una hélice anfipática, caracterizada por un lado polar y otro apolar. Una estructura beta típica tiene un ángulo de 160° entre residuos. Se empleó el programa Pepplot (Wisconsin University, Genetic Computer Group, Inc) para calcular el momento hidrofóbico máximo correspondiente a un ángulo de rotación entre 95° y 105° , la ventana de cálculo empleada fue de 8 residuos.

Resultados

•

1. Proteólisis limitada comparada de tubulina dimerica y microtubulos
Inducidos por taxol.
2. Proteólisis limitada comparada de tubulina dimerica y hojas
de tubulina Inducidas por Zn^{2+} .
3. Predicción de estructura de tubulinas y FtsZ.

1. PROTEOLISIS LIMITADA COMPARADA DE TUBULINA NO POLIMERIZADA Y MICROTUBULOS INDUCIDOS POR TAXOL.

1.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS ESTADOS ESTUDIADOS POR PROTEOLISIS LIMITADA.

1.1.1. TUBULINA NO POLIMERIZADA.

La tubulina autoasocia en presencia de iones Mg^{2+} . El proceso se describe en términos de una rápida y reversible autoasociación progresiva del dímero de tubulina con idéntica constante de equilibrio de elongación, k , y una etapa final de cierre favorecida, cuando se alcanza el grado de polimerización $n = 26 \pm 2$, con $k_{26} > k$ (Frigon y Timasheff 1975).

Los experimentos de proteólisis limitada de tubulina no polimerizada en microtúbulos inducidos por taxol se han realizado en tampón 10 mM NaPi, 6 mM $MgCl_2$, 1 mM GTP, pH 6.7. En estas condiciones y a la concentración de tubulina empleada, ca. 2.0 mg/ml, es de esperar un incipiente estado de asociación de la proteína. Se estudió la extensión de esta asociación mediante velocidad de sedimentación. Se obtuvo un valor del coeficiente de sedimentación promedio de tubulina en tampón 10 mM NaPi, 0.1 mM GTP, pH 7.0, de $S_{20,w}^0 = 5.6$ s (tabla 8), coincidente dentro del error experimental con el descrito por Frigon y Timasheff (Frigon y Timasheff 1975). En presencia de 6 mM $MgCl_2$ y a pH 6.7 se observó un valor ligeramente mayor, 6.6 s. Cuando esta muestra se incubó previamente 30 min a 37° C, de forma análoga a los experimentos de proteólisis limitada, no se observó aumento significativo en el coeficiente de sedimentación ni por lo tanto una extensión del proceso de autoasociación.

A una concentración de Mg^{2+} 8 mM, ligeramente superiores a las empleadas en este trabajo, y a concentraciones de tubulina inferiores a 9 mg/ml no se aprecia formación significativa del polímero final, $n = 26$, y la descripción del proceso se puede simplificar a un modelo de autoasociación lineal indefinida o isodésmico.

Tabla 8. Coeficientes de sedimentación de tubulina^a.

[Mg ²⁺] total	S ⁰ _{20,w}	
	Sin incubar	Incubando 30 min a 37° C
0 mM	5.6 s 5.8 s ^b	7.1 s
6 mM	6.6 s	6.7 s

^a Determinados por el método del segundo momento.

^b Datos de Frigon y Timasheff (1975).

El coeficiente de sedimentación promedio (\bar{S}) es función de los coeficientes de sedimentación de las especies presentes (S_i) y de su abundancia:

$$\bar{S} = \frac{\sum_i S_i C_i}{\sum_i C_i}$$

Se puede suponer que el coeficiente de sedimentación de cada intermedio de la asociación es función del coeficiente de sedimentación de la unidad monomérica del proceso, según la siguiente relación que asume simetría esférica para todas las especies:

$$S_i^0 = S_1^0 (i)^{2/3}$$

Se estimó el coeficiente de sedimentación teórico de cada especie a partir del valor obtenido experimentalmente para la especie monomérica, es decir el heterodímero de $\alpha\beta$ tubulina. A partir de estas estimaciones y de los valores de coeficiente de sedimentación promedio observados se estimó el contenido de los 5 primeros grados de autoasociación (tabla 9). Como las cantidades relativas de los intermedios decrecen al aumentar el grado de asociación no se consideraron especies mayores del pentámero, sin que esto introdujera un error significativo. En las condiciones empleadas cerca del 80 % de la tubulina está en forma heterodimérica, un 20 % de la proteína son intermedios diméricos de autoasociación y en torno al 3% son trímeros. La presencia de tetrámeros y estados de asociación superiores es

despreciable. Independientemente de la naturaleza de los contactos que se establecen, en la interacción entre dos heterodímeros de tubulina sólo se ocluyen la mitad de las superficies de contacto. Por lo tanto se puede estimar que aproximadamente el 90 % de la superficie de la proteína expuesta en el heterodímero es accesible en estas condiciones y se puede considerar la forma no ensamblada de la tubulina como heterodímero de $\alpha\beta$ tubulina.

Tabla 9. Estimación del grado de autoasociación de tubulina Inducido por 6 mM Mg^{2+} .

	Grado de autoasociación (<i>i</i>)				
	1	2	3	4	5
S^0 , (s) ^a	5.6 ^b	8.89	11.65	14.11	16.37
Concentración (mg/ml) ^c	1.54	0.40	0.07	< 0.01	< 0.01
Abundancia relativa (%)	77 %	20 %	3 %	< 1%	< 1%

^a Se supuso simetría esférica.

^b Valor observado en este trabajo.

^c La concentración total de tubulina fue de 2.0 mg/ml.

Se exploró la influencia de las condiciones empleadas sobre la conformación de la tubulina mediante el estudio del dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano. La presencia de los cationes divalentes empleados, 6 mM Mg^{2+} y 2 mM Ca^{2+} , no producen cambios conformacionales detectables y los espectros de dicroísmo circular de tubulina son iguales al registrado en tampón 10 mM NaPi, 0.1 mM GTP, pH 7.0. El espectro de dicroísmo circular no cambió cuando las muestras se preincubaron durante 30 min a 37° C, descartándose una desestabilización de la tubulina no ensamblada (figura 6).

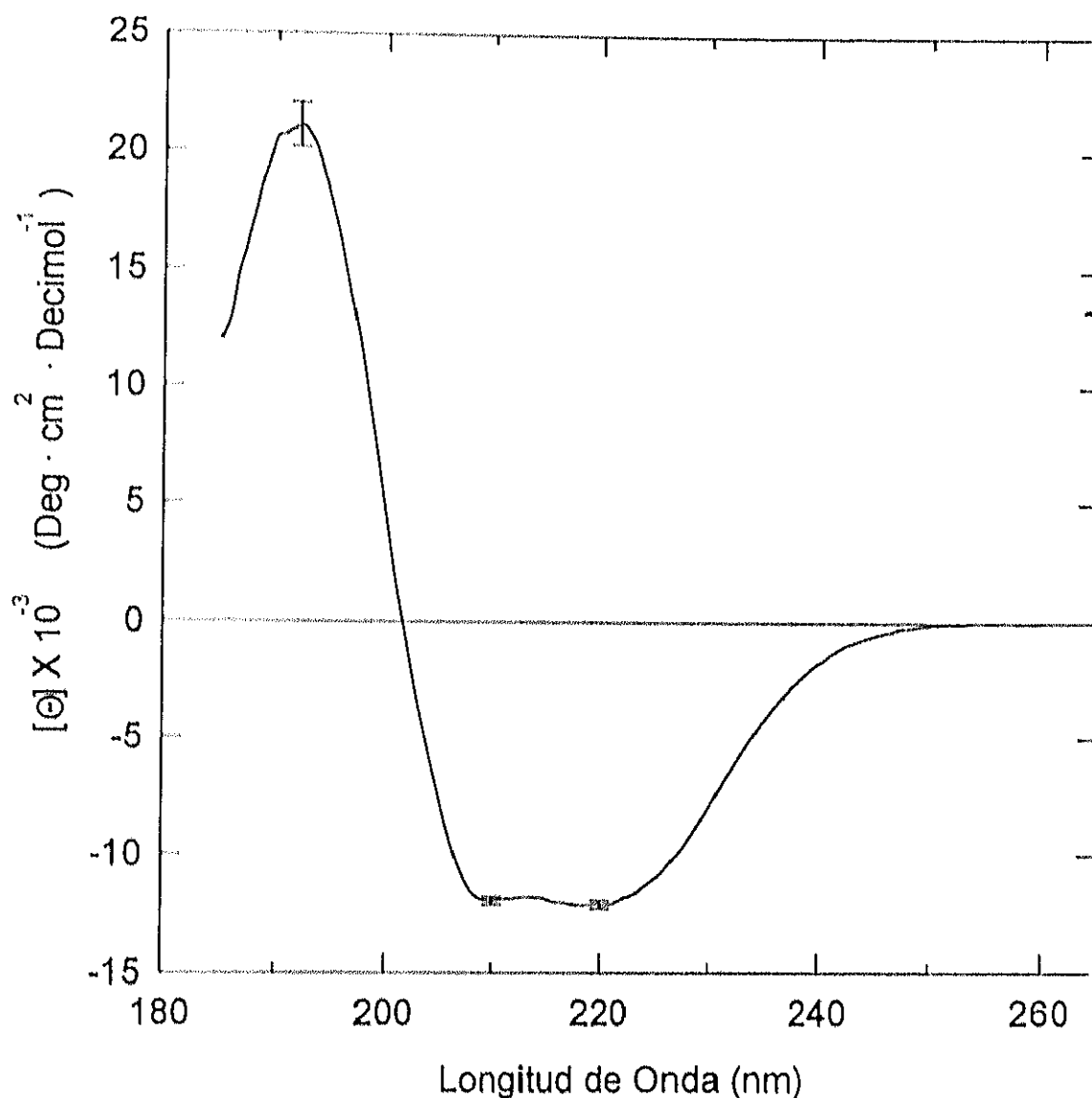


Figura 6. Espectro de dicroísmo circular de tubulina. Se representa al espectro promedio y la desviación estándar de 6 medidas en los siguientes tampones: (a) 10 mM NaPi, 0.1 mM GTP, pH 7.0; (b) 10 mM NaPi, 6 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP, pH 6.7 y (c) 10 mM NaPi, 6 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 0.1 mM GTP, pH 6.7. En cada tampón las medidas se realizaron a 25° C en dos condiciones: con y sin incubar la muestra durante 30 min a 37° C. La desviación entre espectros es del mismo orden de magnitud que el error experimental.

1.1.2. ENSAMBLAJE DE MICROTÚBULOS INDUCIDOS POR TAXOL

El ensamblaje *in vitro* de microtúbulos inducido por taxol, en concentración equimolecular, a 37° C alcanza un máximo estable en los 30 primeros minutos (figura 7). Los microtúbulos así obtenidos despolimerizan en frío. Los microtúbulos son estables a 25° C al menos durante 20 minutos, tiempo empleado en la proteólisis limitada. Como se muestra en la figura 8 la morfología de los microtúbulos así ensamblados es normal. La masa de tubulina en la forma no polimerizada no aumenta apreciablemente durante este tiempo (figura 9). La concentración crítica del ensamblaje a 37° C en tampón 10 mM NaPi, 6 mM MgCl₂, 1 mM GTP, pH 6.7 es de 0.24±0.11 mg/ml. A la concentración de tubulina empleada, c.a. 2.0 mg/ml, la fracción sin ensamblar constituye el 12±5 %. Se puede considerar que los resultados de la proteólisis limitada en las muestras ensambladas son representativos exclusivamente de la proteólisis limitada de los microtúbulos. En ausencia de taxol no se detectó polimerización de la muestra.

La termolisina requiere Ca²⁺ para mantener su actividad proteolítica. En las muestras que se digirieron con esta proteasa el ensamblaje se realizó en presencia de 2 mM CaCl₂. El ensamblaje, monitorizado por la señal de turbidez, la estabilidad, y la morfología de los microtúbulos así obtenidos son equivalentes a los observados en ausencia de CaCl₂ (figuras 7 y 8). La masa de tubulina polimerizada fue similar al control ensamblado en ausencia de Ca²⁺, y no se redujo tras 20 min a 25° C (figura 9).

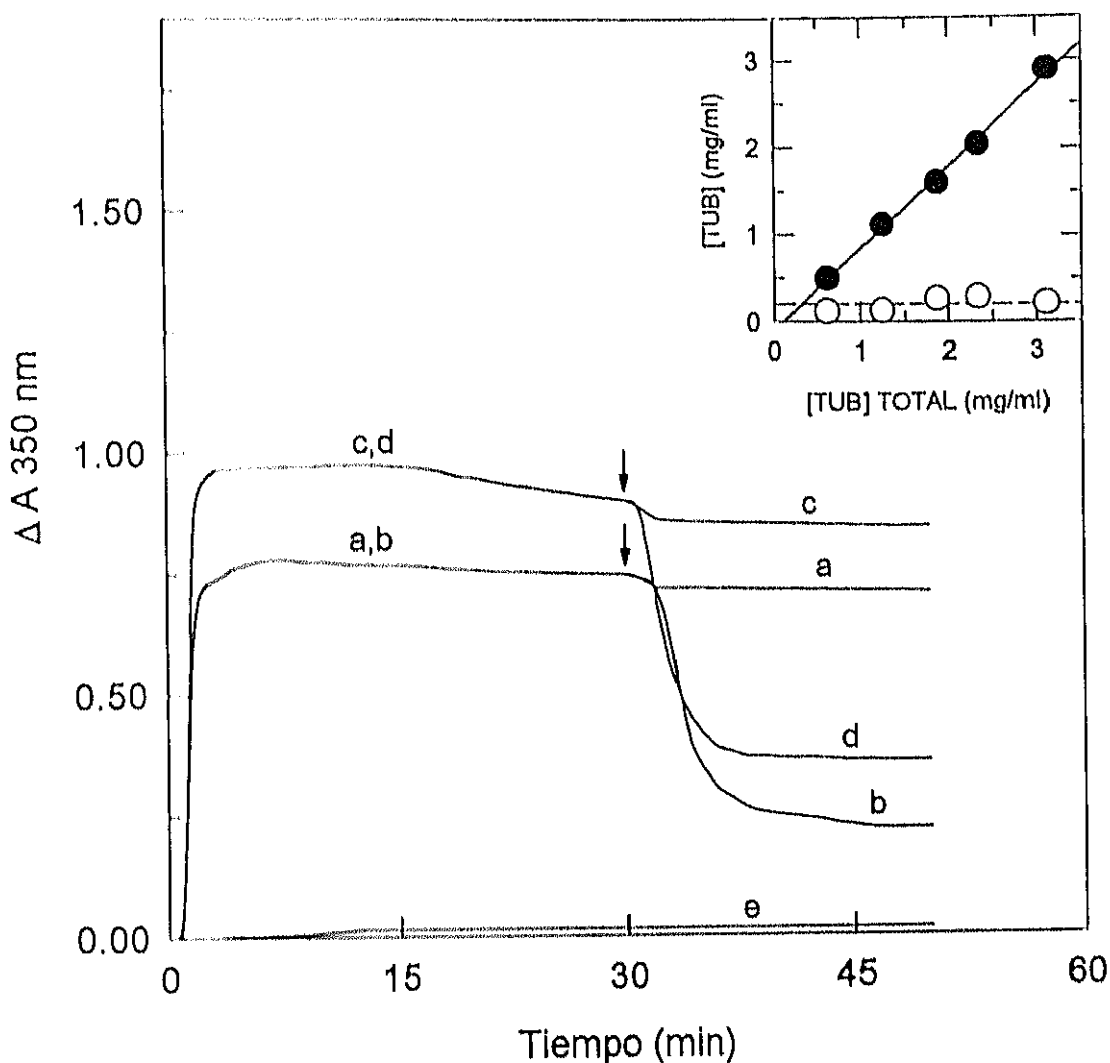


Figura 7. Curso de tiempo turbidimétrico del ensamblaje *in vitro* de tubulina 2.0 mg/ml en tampón 10 mM NaPI, 6 mM MgCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.7. La reacción se inició calentando la muestra de 4° C a 37° C. (a) ensamblaje con 20×10^{-6} M taxol, la flecha indica el enfriamiento de la muestra a 25° C o a 4° C (curva b). (c) ensamblaje con 20×10^{-6} M taxol en presencia de 2 mM CaCl_2 , la flecha indica el enfriamiento de la muestra a 25° C o a 4° C (curva d). (e) muestra sin taxol. Inserto: cuantificación del ensamblaje de tubulina *in vitro* inducido por taxol a 37° C. (●) concentración de tubulina polimerizada. (○) concentración de tubulina dimérica. (línea de trazo continuo) recta de regresión lineal de la concentración de tubulina ensamblada frente a concentración total de tubulina. (línea de trazo discontinuo) valor medio de la concentración de tubulina no polimerizada.

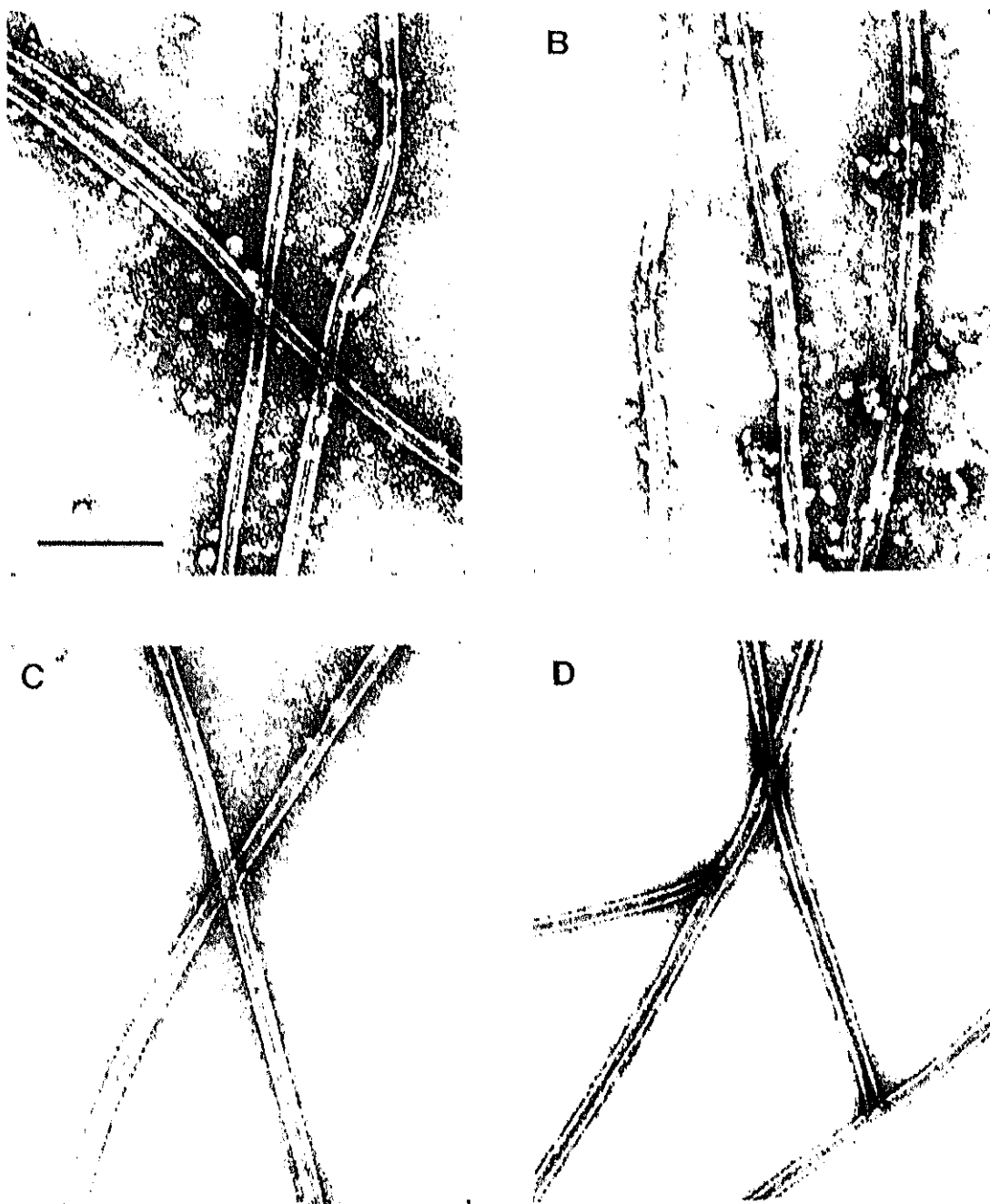


Figura 8. Micrografías electrónicas de microtúbulos inducidos por taxol en tampón 10 mM NaPi, 6 mM MgCl₂, 1 mM GTP, pH 6.7 a 37° C (panel A), y después de enfriar la muestra a 25° C durante 20 min (panel B). Y en tampón 10 mM NaPi, 6 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1 mM GTP, pH 6.7 a 37° C (panel C), y después de enfriar la muestra a 25° durante 20 min (panel D). La barra corresponde a 200 nm.

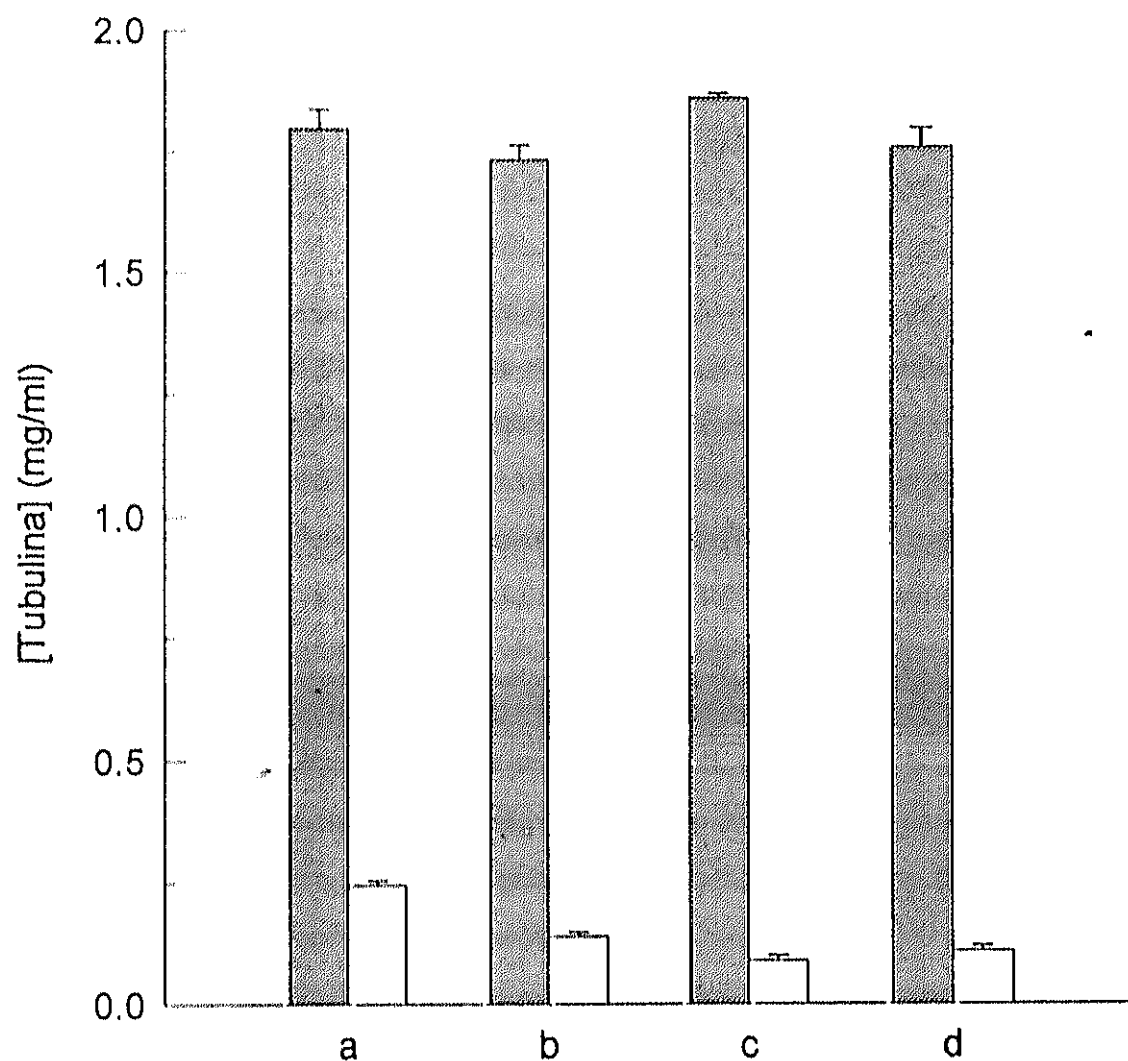


Figura 9. Cuantificación de la masa de tubulina no polimerizada (barras huecas) y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (barras rayadas). Las muestras de tubulina se polimerizaron en presencia de una cantidad equimolecular de taxol: (a y c) durante 30 min a 37° C y (b y d) durante 30 min a 37° C y posterior incubación de 20 min a 25° C. (c y d) polimerización en presencia de 2 mM Ca^{2+} .

1.2. PROTEOLISIS LIMITADA CON TRIPSINA.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol, producido por tripsina 1% (p/p) se muestra en la figura 11. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 12, y sus características se indican en la tabla 10.

Cadena α :

En la forma dimérica el principal punto de corte se encuentra en la cadena α , entre las posiciones K339-S340. Este punto de corte se protege en los microtúbulos inducidos por taxol, coincidente con los resultados de Mandelkow (Mandelkow, Herrmann et al. 1985).

En la proteólisis de la tubulina ensamblada destaca la aparición de un fragmento, TX-TR α 2, que es reconocido por el anticuerpo frente a α (415-443) y tiene una movilidad electroforética ligeramente inferior al péptido α (340-450), TR α 2. Aunque TX-TR α 2 migra aparentemente aislado en electroforesis, no ha sido posible determinar su secuencia y debe bloquearse durante la purificación. Por la relación de PM aparentes de este péptido y α (340-450), el PM teórico de TX-TR α 2 debe ser 13-14 kD lo que sitúa el punto de corte en la región 325-335. Según la especificidad de la tripsina hay dos posibles puntos de corte: K326-D327 y K336-T337 (figura 10A). La predicción de estructura secundaria (ver adelante) sitúa estas dos Lys en ambos extremos de una α hélice.

A	310	320	330	340	350	360
aa	GK	YMACCLLYRGDVVPK	DVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPTGFKVGINYEPP			
B	280	290	300	310	320	330
aa	QYRALTVPELTQQMFDAKNMMAACDPRHGRYLTVA	AVFRGRMSMKEVDEQM				

Figura 10. Secuencia de la región 310-360 de α -tubulina (A) y 280-330 de β -tubulina (B) de cerebro porcino. En negrilla se indican los residuos de Arg y Lys, potenciales puntos de corte de tripsina.

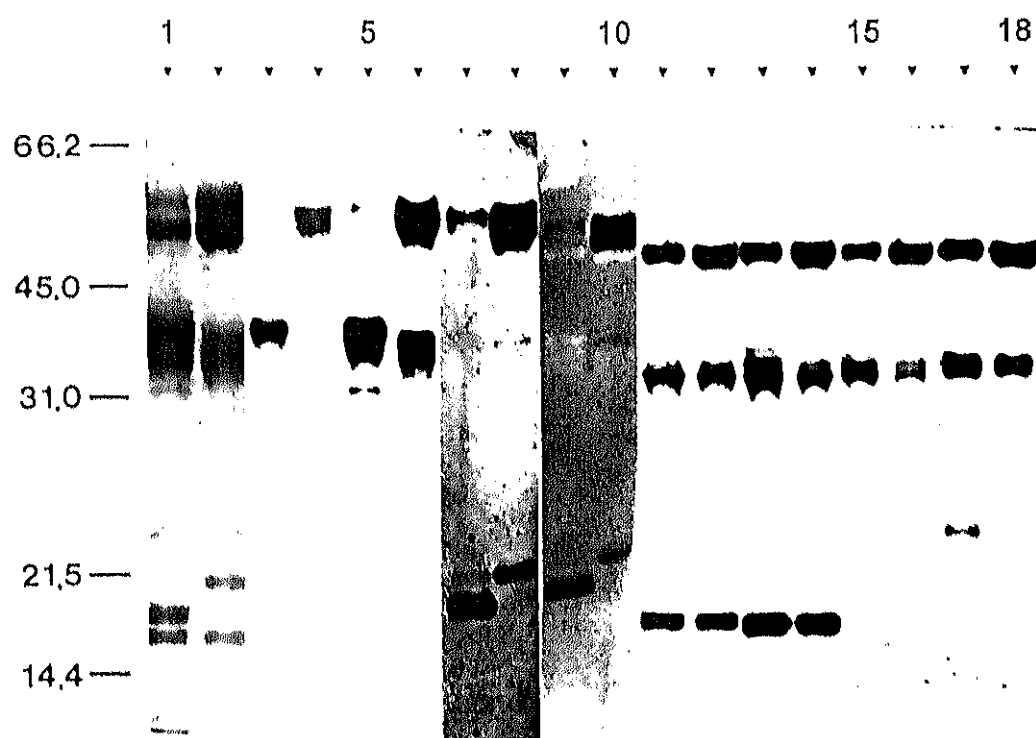


Figura 11. Proteólisis limitada con tripsina-TPCK 1% de tubulina en forma dimérica (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17) y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18) en tampón 10 mM NaPi, 6 mM $MgCl_2$, 1 mM GTP, pH 6.7. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 18) inmunodetección con los anticuerpos: anti α (155-168) (calles 3 y 4), anti α (214-226) (calles 5 y 6), anti α (415-443) (calles 7 y 8), anti α -tubulina tirosinada (calles 9 y 10), anti β (1-13) (calles 11 y 12), anti β (153-165) (calles 13 y 14), anti β (241-256) (calles 15 y 16) y anti β (412-431) (calles 17 y 18). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular en kD.

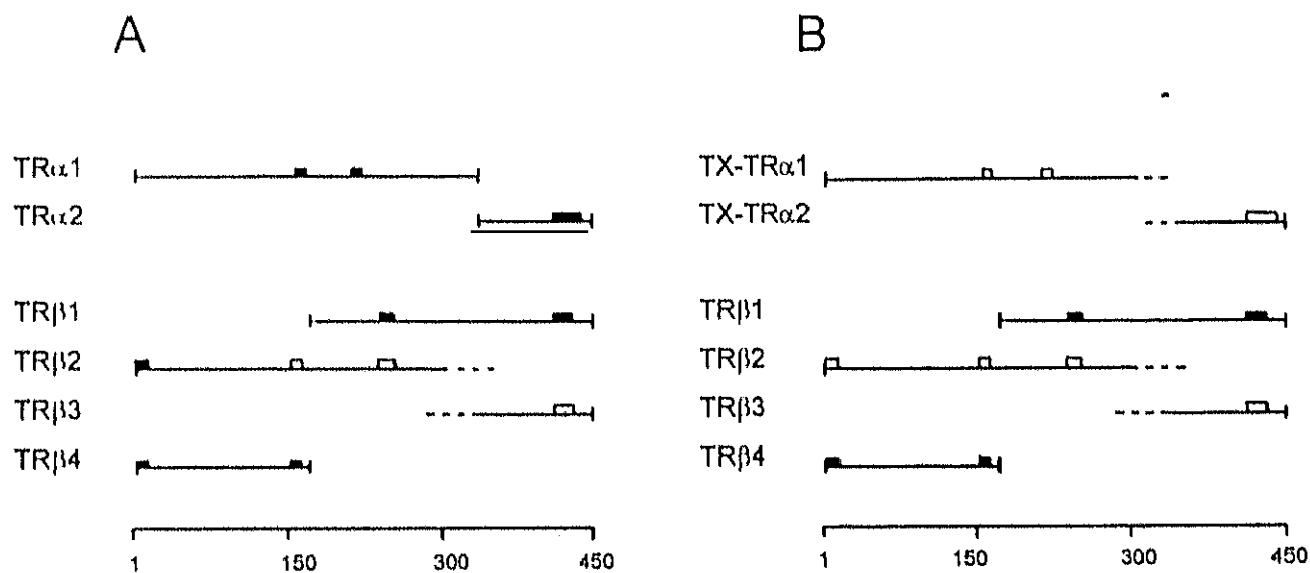


Figura 12. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con tripsina-TPCK de tubulina dimérica (A) y tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítopos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

Cadena β :

Con anterioridad solo se ha descrito la actividad de la tripsina sobre la α -tubulina sin embargo hemos observado dos puntos de corte en la cadena β .

El primero se localiza entre las posiciones K174-V175, genera los fragmentos TR β 4 y TR β 1, y es accesible en los microtúbulos inducidos por taxol.

El segundo punto genera los fragmentos TR β 2 y TR β 3. A partir de los datos de PM aparente este punto de corte está localizado en la región 280-325. Los residuos de Lys y Arg presentes en esta región y potenciales localizaciones de este corte son: R282, K297, R306, R309, R318, R320 y K324 (figura 10B). Este corte se protege en la tubulina polimerizada en microtúbulos de taxol.

Tabla 10. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina con Tripsina-TPCK 1%(p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
TR α 1	38.6 \pm 1.3	33.6 \pm 1.3	¹ MxExIxI	1 a 339	37520
TR α 2	16.2 \pm 0.6	13.4 \pm 0.6	³⁴⁰ SIQFV	340 a 451	12576
TR β 1	35.3 \pm 1.2	30.5 \pm 1.2	¹⁷⁵ VxDTVVEP	175 a 445	30887
TR β 2	34.7 \pm 1.2	32.2 \pm 1.2	n.d.	1 a 292 \pm 8	n.d.
TR β 3	20.6 \pm 0.7	14.9 \pm 0.7	n.d.	315 \pm 9 a 445	n.d.
TR β 4	15.0 \pm 0.5	14.1 \pm 0.5	¹ MxEIVxIQ	1 a 174	18986
TX-TR α 1	36.4 \pm 1.3	31.9 \pm 1.3	n.d.	1 a 289 \pm 10	n.d.
TX-TR α 2	17.7 \pm 0.6	14.5 \pm 0.6	n.d.	318 \pm 8 a 451	n.d.

1.3. PROTEOLISIS LIMITADA CON QUIMOTRIPSINA.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol, producido por quimotripsina 2% (p/p) se muestra en la figura 13. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 14, y sus características se indican en la tabla 11.

Cadena α :

La α -tubulina es poco sensible a quimotripsina. Sin embargo se observan dos péptidos complementarios producidos por la ruptura del enlace entre las posiciones F169-S170. Este punto de corte es ligeramente más sensible en la tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol.

Cadena β :

La quimotripsina corta mayoritariamente la β -tubulina dimérica entre las posiciones Y281-R282, y no actúa sobre esta posición en la proteína ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol.

Se observan dos péptidos de bajo peso molecular aparente, CH β 3 (18.5 kD) y CH β 4 (15 kD), que son reconocidos por los anticuerpos anti β (1-13) y anti β (153-165). No se han detectado los péptidos complementarios. A partir del PM aparente los puntos de corte que los originan se localizan antes de la posición 165. Sin embargo por la reactividad con el anticuerpo anti β (153-165), se localizan en posiciones posteriores pero muy próximas a este epítopo. Los potenciales puntos de corte se encuentran en el lado carboxilo de los residuos: F168 y Y183 (figura 15). Estos puntos de corte son accesibles en los microtúbulos inducidos por taxol.

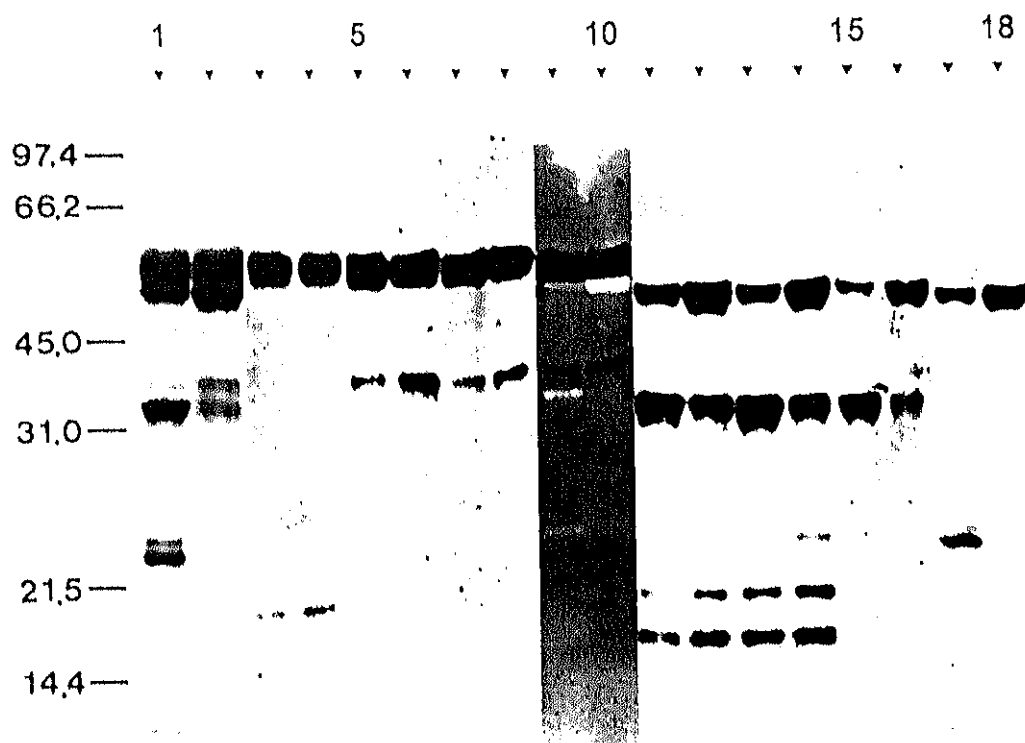


Figura 13. Proteólisis limitada con quimotripsina-TLCK 2% de tubulina en forma dimérica (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17) y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18) en tampón 10 mM NaPi, 6 mM $MgCl_2$, 1 mM GTP, pH 6.7. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 18) inmunodetección con los anticuerpos: anti α (155-168) (calles 3 y 4), anti α (214-226) (calles 5 y 6), anti α (415-443) (calles 7 y 8), anti α -tubulina tirosinada (calles 9 y 10), anti β (1-13) (calles 11 y 12), anti β (153-165) (calles 13 y 14), anti β (241-256) (calles 15 y 16) y anti β (412-431) (calles 17 y 18). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular en kD.

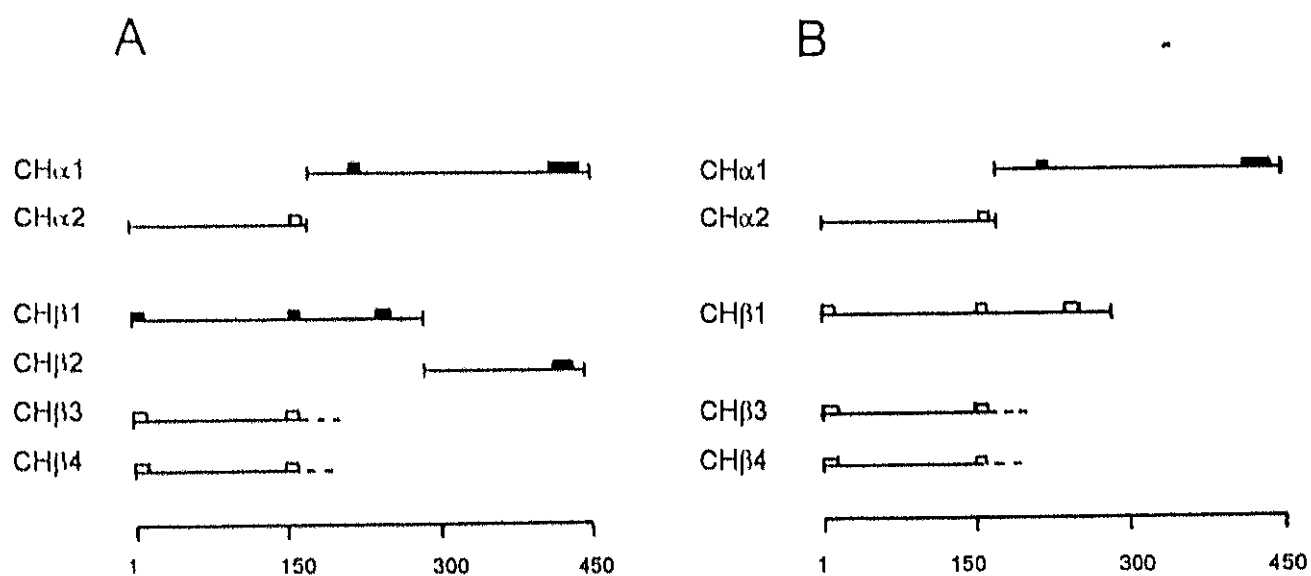


Figura 14. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con quimotripsina de tubulina dimérica (A) y tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítomos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

150 160 170 180 190
 aa LLISKIREEYYPDRIMNTFSVVPSPKVSDTVVEPYNATLSVH

Figura 15. Secuencia de la región 150-190 de β -tubulina de cerebro porcino. Se ha subrayado la región correspondiente al epítopo β (153-165). En negrilla se indican los aminoácidos aromáticos, potenciales puntos de corte de quimotripsina.

Tabla 11. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina con Quimotripsina-TLCK 2% (p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
CH α 1	40.8 \pm 1.4	32.5 \pm 1.5	¹⁷⁰ SIYPAPQVS	170 a 451	31529
CH α 2	16.3 \pm 0.6	16.6 \pm 0.6	n.d.	1 a 169	18567
CH β 1	36.9 \pm 1.3	34.2 \pm 1.3	n.d.	1 a 281	30960
CH β 2	22.3 \pm 0.8	16.7 \pm 0.8	²⁸² xALTVPxL	282 a 445	18913
CH β 3	18.5 \pm 0.6	17.3 \pm 0.6	n.d.	1 a 160 \pm 5	n.d.
CH β 4	15.2 \pm 0.5	14.3 \pm 0.5	n.d.	1 a 130 \pm 5	n.d.

1.4. PROTEOLISIS LIMITADA CON ELASTASA.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol, producido por elastasa 2% (p/p) se muestra en la figura 16. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 17, y sus características se indican en la tabla 12.

Cadena α :

Se observan dos puntos de corte en esta cadena. El primero, que produce los fragmentos complementarios EL α 4 y EL α 1, se localiza entre las posiciones S178-T179. El segundo corte genera los péptidos EL α 2 y EL α 3, y se produce entre los residuos A294-C295.

Cadena β :

La elastasa digiere la tubulina en un único punto de corte. A partir de la secuencia amino terminal de EL β 2 se ha localizado el punto de corte entre las posiciones C354-D355.

Los tres puntos de corte de la elastasa en las α y β -tubulina son igualmente sensibles en los microtúbulos inducidos por taxol.

Tabla 12. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina con Elastasa 2% (p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
EL α 1	39.1 \pm 1.4	31.2 \pm 1.4	¹⁷⁹ TAVV	179 a 451	30585
EL α 2	37.2 \pm 1.3	32.6 \pm 1.3	n.d.	1 a 294	32481
EL α 3	19.3 \pm 0.7	15.8 \pm 0.7	²⁹⁵ XFEPANQMVK	295 a 451	17615
EL α 4	17.8 \pm 0.6	17.8 \pm 0.6	n.d.	1 a 178	19510
EL β 1	39.1 \pm 1.4	36.3 \pm 1.4	¹ MREIV	1 a 354	39326
EL β 2	19.0 \pm 0.7	13.2 \pm 0.7	³⁵⁵ DIPPxGLK	355 a 445	10547

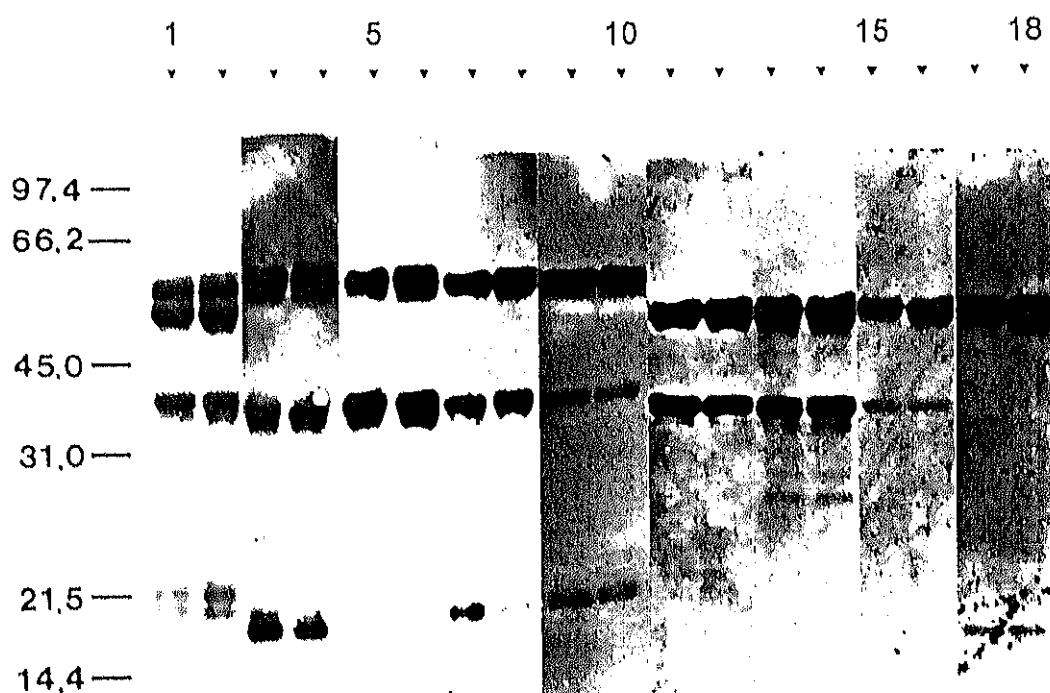


Figura 16. Proteólisis limitada con elastasa 2% de tubulina en forma dimérica (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17) y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18) en tampón 10 mM NaPi, 6 mM MgCl₂, 1 mM GTP, pH 6.7. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 18) inmunodetección con los anticuerpos: anti α (155-168) (calles 3 y 4), anti α (214-226) (calles 5 y 6), anti α (415-443) (calles 7 y 8), anti α -tubulina tirosinada (calles 9 y 10), anti β (1-13) (calles 11 y 12), anti β (153-165) (calles 13 y 14), anti β (241-256) (calles 15 y 16) y anti β (412-431) (calles 17 y 18). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular en kD.

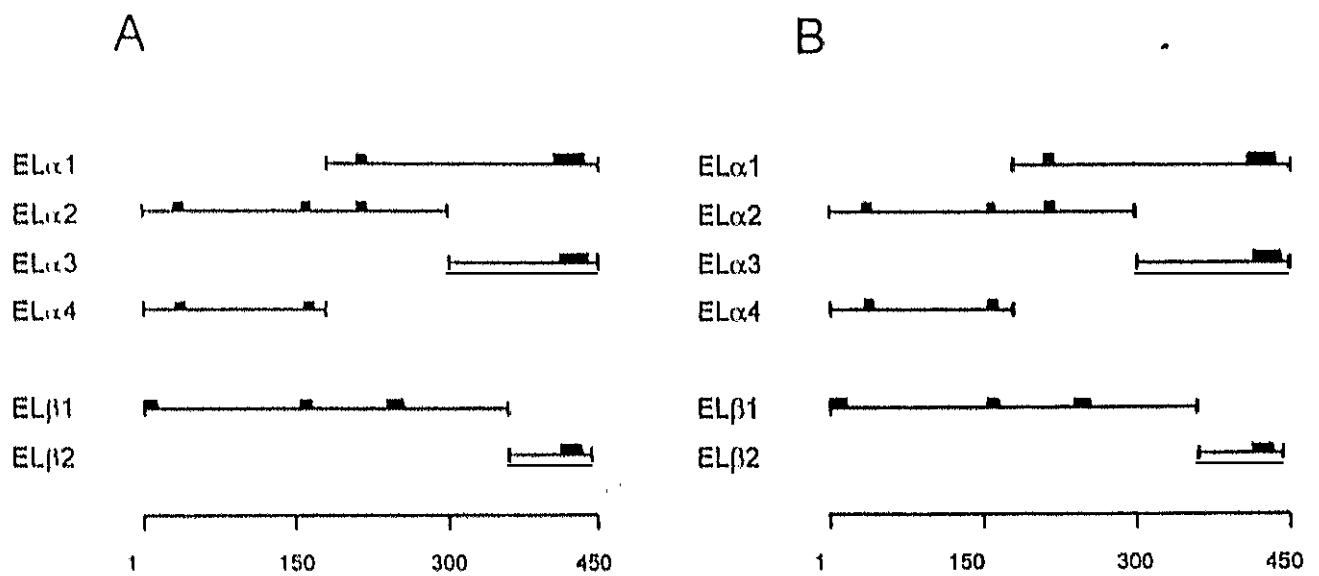


Figura 17. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con elastasa de tubulina dimérica (A) y tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítopos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos.

1.5. PROTEOLISIS LIMITADA CON CLOSTRIPAINA.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol, producido por clostripaina 2% (p/p) se muestra en la figura 18. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 19, y sus características se indican en la tabla 13.

Cadena α :

La clostripaina proteoliza la α -tubulina en el mismo punto de corte que la tripsina, entre los residuos R339-T340. Al igual que con la tripsina, este punto de proteólisis está protegido en la α -tubulina polimerizada en microtúbulos inducidos por taxol. Sin embargo la clostripaina, a diferencia de la tripsina, no produce un nuevo punto de corte en la forma ensamblada. Se explica teniendo en cuenta la especificidad de ambas proteasas: las dos cortan enlaces peptídicos del tipo R-X pero la tripsina además también actúa sobre los de tipo K-X.

Se observa un fragmento minoritario, CL α 2. Como no se ha detectado un fragmento complementario se supone que se produce a partir de CL α 1 por un segundo corte en el que se pierden c.a. 65 aa. El único residuo de Arg presente en esa región y potencial punto de corte es R264-A265 (figura 20A). Este punto de digestión también se protege en la α -tubulina polimerizada.

Cadena β :

La clostripaina digiere débilmente la β -tubulina. Cuando se emplea una proporción de clostripaina del 2% aparecen una serie de fragmentos minoritarios.

CL β 2 es un fragmento minoritario. Por su PM aparente el corte que lo origina se localiza en torno a la posición 120. El residuo de Arg que potencialmente puede participar en este corte es R121-K122. Es la única Arg presente en esta región (figura 20B). No se detecta el correspondiente fragmento complementario de este corte.

CL β 5 es un fragmento de bajo PM (PMap 22 kD) reconocido por el anticuerpo anti β (412-431). A partir de su secuencia amino terminal se ha localizado el corte que lo produce entre las posiciones R282-A283. CL β 4 es el fragmento complementario. Este punto de corte está próximo al que produce la quimotripsina entre las posiciones Y280-R281.

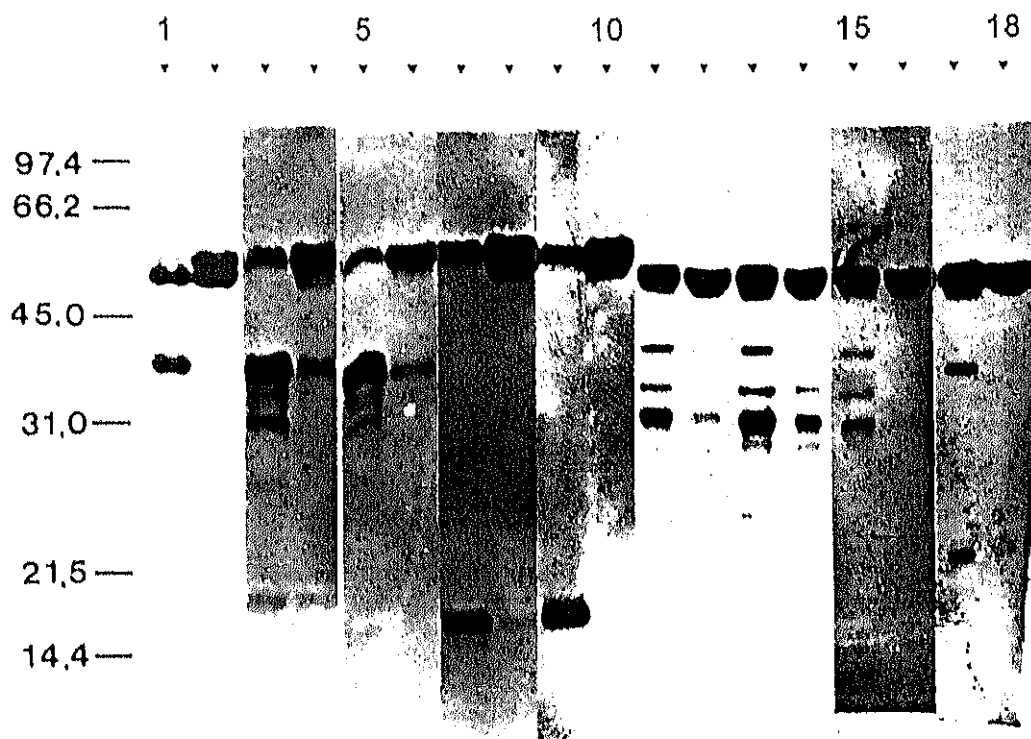


Figura 18. Proteólisis limitada con clostripaina 2% de tubulina en forma dimérica (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17) y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18) en tampón 10 mM NaPi, 6 mM $MgCl_2$, 1 mM GTP, pH 6.7. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 18) inmunodetección con los anticuerpos: anti α (155-168) (calles 3 y 4), anti α (214-226) (calles 5 y 6), anti α (415-443) (calles 7 y 8), anti α -tubulina tirosinada (calles 9 y 10), anti β (1-13) (calles 11 y 12), anti β (153-165) (calles 13 y 14), anti β (241-256) (calles 15 y 16) y anti β (412-431) (calles 17 y 18). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular en kD.

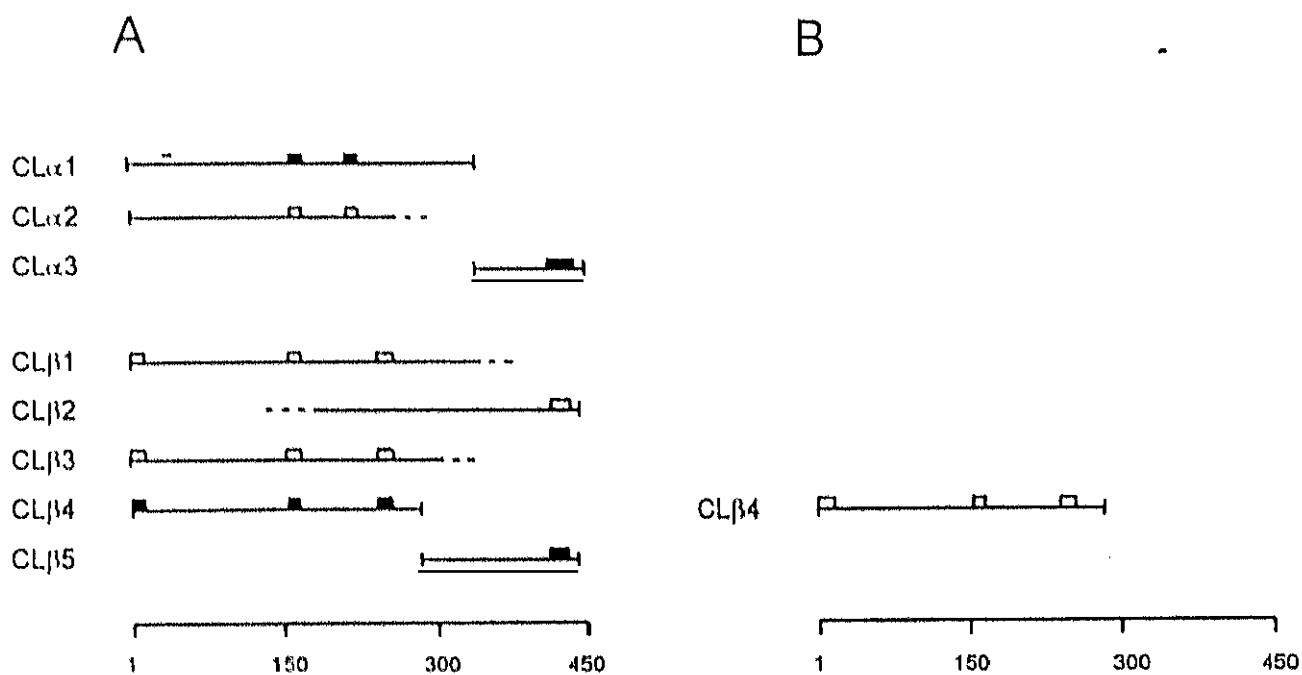


Figura 19. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con clostripaina de tubulina dimérica (A) y tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítomos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

CL β 1 y CL β 3 son dos fragmentos minoritarios de alto PM aparente. No se detectan los fragmentos complementarios. Los puntos de proteólisis en los que se producen se localizan en las regiones 305-325 y 361-381, respectivamente. Los residuos de Arg que potencialmente pueden participar en estos puntos de corte son: R306, R309, R318 y R320, y R359 y R380, respectivamente (figura 20C,D).

La digestión de la β -tubulina por la clostripaina se reduce cuando está ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol.

A	250	260	270	280	290	300
aa	VDLTEFQTNLVPYPRAHFPLATYAPVISAEKAYHEQLSVAEITNACFEPAN					
B	110	120	130	140	150	160
aa	AELVDSVIDVVRKESESCDCLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTLTLLISKIREEYPDRIMN					
C	290	300	310	320	330	
aa	TQQMFDAKNMMAACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQM					
D	350	360	370	380	390	
aa	KTAVCDIPPRGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFR					

Figura 20. Secuencias de las regiones 250-300 de α -tubulina (A), 110-165 (B), 290-320 (C) y 350-390 (D) de β -tubulina de cerebro porcino. Se ha subrayado la región correspondiente al epítopo β (153-165). En negrilla se indican los residuos de Arg, potenciales puntos de proteólisis limitada de clostripaina.

Tabla 13. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina con Clostripaina 2%(p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
CL α 1	40.6 \pm 1.4	35.2 \pm 1.4	n.d.	1 a 339	37520
CL α 2	34.1 \pm 1.2	30.2 \pm 1.2	n.d.	1 a 275 \pm 10	29238 ^a
CL α 3	17.0 \pm 0.6	14 \pm 0.6	³⁴⁰ XIQFV	340 a 451	12576
CL β 1	44.6 \pm 1.5	41.3 \pm 1.5	n.d.	1 a 371 \pm 10	n.d.
CL β 2	41.2 \pm 1.5	36.7 \pm 1.5	n.d.	119 \pm 9 a 445	36535 ^b
CL β 3	37.5 \pm 1.3	34.8 \pm 1.3	n.d.	1 a 315 \pm 9	n.d.
CL β 4	34.1 \pm 1.2	31.7 \pm 1.2	n.d.	1 a 282	31117
CL β 5	22.0 \pm 0.8	16.4 \pm 0.8	²⁸³ ALxVPxGxQQM	283 a 445	18757

^a Suponiendo que CL α 2 corresponde a α (1-264)

^b Suponiendo que CL β 2 corresponde a β (122-445)

1.6. PROTEOLISIS LIMITADA CON ENDOPROTEINASA LYS-C.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimerica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol, producido por endoproteinasa Lys-C 0.5 U/ml se muestra en la figura 21. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 22, y sus características se indican en la tabla 15.

Cadena α :

La endoproteinasa Lys-C actúa mayoritariamente sobre la α -tubulina produciendo un mapa peptídico característico.

Se observa un fragmento, LC α 1, de PM aparente ligeramente menor al de la α -tubulina y que comigra con la β -tubulina. Este fragmento es reconocido en inmunoblot por todos los anticuerpos anti α -tubulina empleados a excepción del anti α -tubulina acetilada, como es reconocido por el anticuerpo frente α -tubulina tirosinada tiene intacto el extremo carboxilo. La secuencia del extremo amino de este fragmento sitúa el corte que lo genera entre las posiciones K40-T41. Este punto de corte sigue siendo sensible en la proteólisis limitada de microtúbulos inducidos por taxol y la presencia del fragmento LC α 1 aumenta en estas condiciones. El grupo ϵ -amino del residuo de lisina en posición 40 es un punto de acetilación de la α -tubulina (Piperno, LeDizet et al. 1987).

Empleando el anticuerpo 6-11B-1 frente a α -tubulina acetilada se ha detectado un péptido, LC α 6, de PM aparente 18 kD que no se aprecia mediante la tinción con coomassie. Se ha identificado con el fragmento α (1-40) complementario de LC α 1. Este fragmento está presente en igual cantidad en las muestras de proteólisis limitada de tubulina dimerica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol.

A parte de LC α 1, se detecta un sólo fragmento, LC α 5, reconocido por los anti α (415-445) y anti α -tubulina tirosinada. La secuencia amino terminal sitúa el punto de corte que lo origina entre las posiciones K280-A281. Esta posición de proteólisis se protege en la tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol y como consecuencia se reduce la formación de LC α 5 y se acumula el fragmento LC α 1 ya que no es procesado posteriormente en K280-A281.

Como fragmento complementario de este corte no aparece un único péptido, sino un

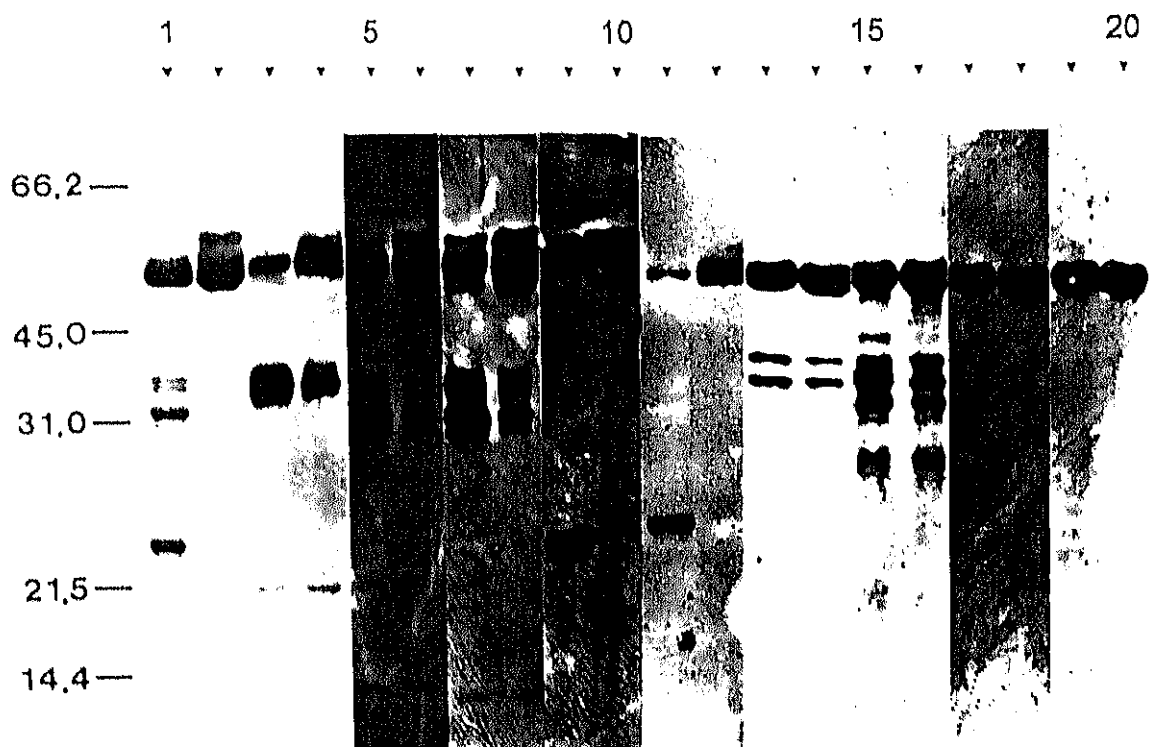


Figura 21. Proteólisis limitada con endoproteínasa Lys-C 0.5 U/ml de tubulina en forma dimérica (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19) y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20) en tampón 10 mM NaPi, 6 mM MgCl₂, 1 mM GTP, pH 6.7. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 20) inmunodetección con los anticuerpos: anti α -tubulina acetilada en Lys40 (calles 3 y 4), anti α (155-168) (calles 5 y 6), anti α (214-226) (calles 7 y 8), anti α (415-443) (calles 9 y 10), anti α -tubulina tirosinada (calles 11 y 12), anti β (1-13) (calles 13 y 14), anti β (153-165) (calles 15 y 16), anti β (241-256) (calles 17 y 18) y anti β (412-431) (calles 19 y 20). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular en kD.

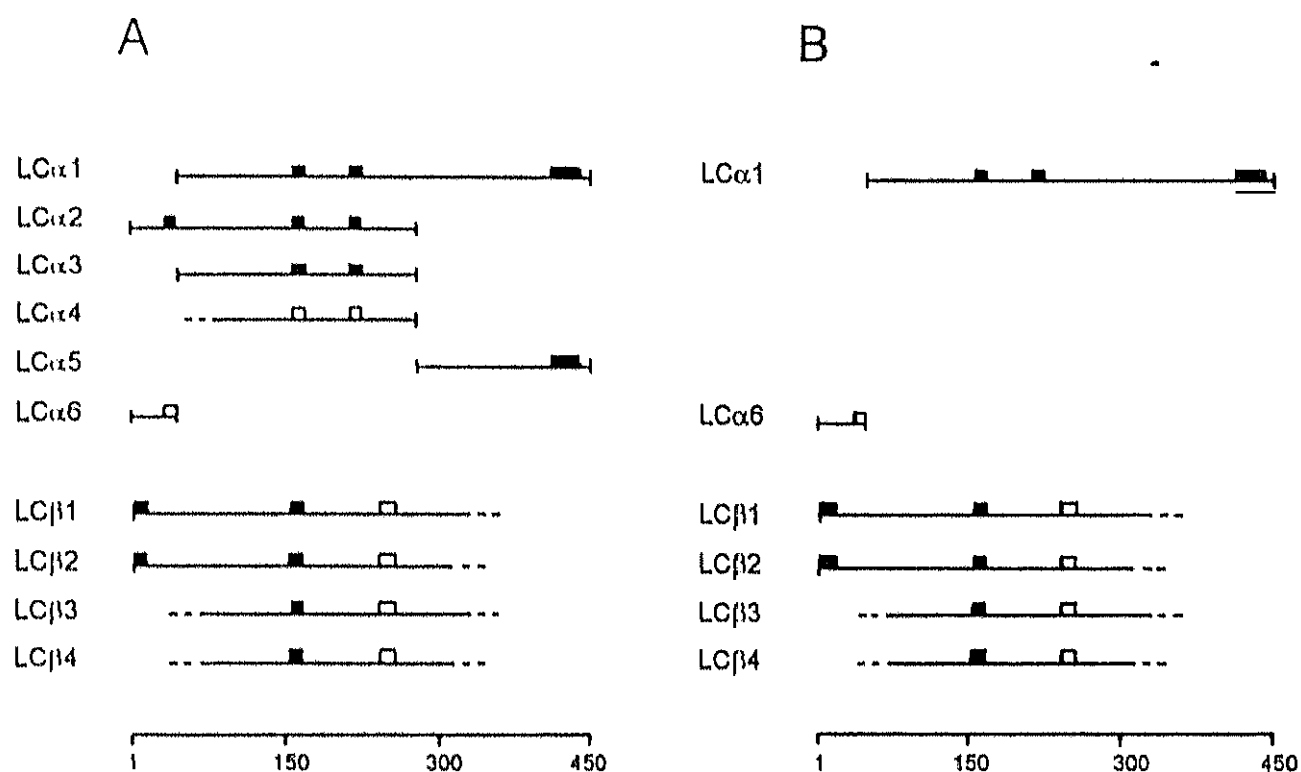


Figura 22. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con endoproteínasa Lys-C de tubulina dimérica (A) y tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítomos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

conjunto de tres: LC α 2, LC α 3 y LC α 4. La secuencia N-terminal de LC α 2 corresponde con la de la α -tubulina, este fragmento es el de mayor peso molecular aparente de los tres y se identifica como α (1-280), siendo complementario de LC α 5. Los otros dos fragmentos de esta serie pueden producirse bien por cortes secundarios cerca de los nuevos extremos carboxilo generados tras el primer corte, o bien por cortes cerca del extremo amino terminal de la tubulina. LC α 3 es el fragmento mayoritario de este grupo. Se ha secuenciado su extremo N-terminal, que es igual al observado para el fragmento LC α 1 y corresponde a un corte entre las posiciones K40-T41. Por lo tanto el fragmento LC α 3 se origina por una doble digestión entre las posiciones K40-T41 y K280-A281.

LC α 4 es un fragmento de PM aparente ligeramente inferior a LC α 3 que es reconocido por los mismos anticuerpos que éste. Se origina en una doble digestión. Uno de los puntos de corte se produce entre K280-A281. No se conoce la secuencia amino terminal de LC α 4. El otro punto de corte que lo origina se localiza secuencialmente más avanzado al que origina LC α 1 y LC α 3. Por otro lado LC α 4 contiene el epítipo α (155-168). Esta proteasa hidroliza enlaces peptídicos en los que el grupo carbonilo es donado por una Lys. Este punto de corte se localiza tras uno de los siguientes residuos: K60, K96, K112 o K124 (figura 23A). Por comparación entre el peso molecular aparente corregido de LC α 4 y el peso molecular teórico de los fragmentos formados si el corte se produce en cada uno de estos puntos (tabla 14), el punto de proteólisis más probable es K60-H61.

La presencia de estos tres fragmentos, LC α 2, LC α 3 y LC α 4, se reduce drásticamente en la proteólisis limitada de microtúbulos inducidos por taxol como consecuencia de estar protegido el punto de corte K280-A281. No se puede estimar si el corte minoritario en K60-H61 se protege en la forma polimerizada, ya que sólo se detecta gracias a la presencia de LC α 4, que no se produce en la forma ensamblada por protección del enlace K280-A281.

A	55	60	70	80	90	100	110	120
aa	ETGAGKHV	PRAVFVD	LEPTVIDE	VRTGTYR	QLFHPE	QLITGK	EDAANN	YARGHYTIGKEIIDLVLDRIK L
B	30	40	50	60	70	80	90	
aa	IDPTGSYH	GDSDLQ	LERINV	YYNEA	AGNKYV	PRAILV	DLEPGT	MDSVRSGPFGQIFRPD NF
C	300	310	320	330	340	350	360	
aa	MAACDPRH	IGRYLT	VAAVFR	GRMSM	KEVDEQ	MLNVQN	KNSSYF	VEWIPNNVKTAVCDIP PRG

Figura 23. Secuencias de las regiones 55-125 de α -tubulina (A), 30-90 (B) y 300-360 (C) de β -tubulina de cerebro porcino. En negrilla se indican los residuos de Lys, potenciales puntos de proteólisis limitada de endoproteinasa Lys-C.

Tabla 14. Posibles secuencias del fragmento LC α 4.

Punto de Corte	Posición	PM teórico (D)	PMcor (kD)
K60-H61	61-280	24565	26.7
K96-E97	97-280	20419	21.3
K112-E113	113-280	18657	19.0
K124-L125	125-280	17192	17.1

Cadena β :

Endoproteinasa Lys-C digiere débilmente la cadena de β -tubulina. Hay cuatro péptidos que reaccionan con el anticuerpo frente $\beta(153-165)$ y débilmente con el anti $\beta(241-256)$.

Sólo dos de ellos, LC β 1 y LC β 2, reaccionan con el anticuerpo anti $\beta(1-13)$. Son originados en dos cortes en la región 300-350. Los residuos de Lys que participan en los posibles puntos de corte son: K324, K336 y K350 (figura 23C). No se detectan los fragmentos complementarios de estos puntos de corte.

Un tercer punto de corte se localiza cerca del extremo amino terminal de la β -tubulina, entre las posiciones 30 a 85. El único residuo de Lys en esta región es K58, siendo K58-Y59 el putativo punto de corte. Este corte produce los fragmentos LC β 3 y LC β 4, a partir de LC β 1 y LC β 2 respectivamente.

Estos tres puntos de corte no se protegen en la tubulina polimerizada en microtúbulos inducidos por taxol.

Tabla 15. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina con Endoproteinasa Lys-C 0.5 U/ml.

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
LC α 1	58.8 \pm 2.1	46.5 \pm 2.1	⁴¹ TIGGGDDS	41 a 451	45679
LC α 2	38.6 \pm 1.4	33.6 \pm 1.4	¹ MREXISI	1 a 280	30953
LC α 3	34.6 \pm 1.2	30.6 \pm 1.2	⁴¹ TIGGGDDS	41 a 280	26555
LC α 4	32.9 \pm 1.2	29.3 \pm 1.2	n.d.	c.a. 60 a 280	24552 ^a
LC α 5	22.0 \pm 0.8	17.9 \pm 0.8	²⁸¹ AYxEQLxVAEI	281 a 451	19143
LC α 6	18.0 \pm 0.6	17.9 \pm 0.6	n.d.	1 a 40	4416
LC β 1	40.6 \pm 1.4	37.6 \pm 1.4	n.d.	1 a 339 \pm 9	n.d.
LC β 2	37.1 \pm 1.3	34.4 \pm 1.3	n.d.	1 a 312 \pm 9	n.d.
LC β 3	34.6 \pm 1.2	32.1 \pm 1.2	n.d.	49 \pm 16 a 339 \pm 9	n.d.
LC β 4	28.7 \pm 1.0	26.7 \pm 1.0	n.d.	68 \pm 16 a 312 \pm 9	n.d.

^a Suponiendo que LC α 4 corresponde a $\alpha(61-280)$.

1.7. PROTEOLÍISIS LIMITADA CON TERMOLISINA.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol, producido por termolisina 1.5% (p/p) se muestra en la figura 24. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 25, y sus características se indican en la tabla 16.

Cadena α :

A partir del mapa peptídico generado en la proteólisis limitada de α -tubulina con termolisina se ha interpretado que esta proteasa actúa principalmente en tres puntos.

Cerca del extremo amino existe un punto de corte que genera el fragmento TH α 1, con una movilidad electroforética igual a la β -tubulina sin digerir. La secuencia amino terminal de este fragmento sitúa este corte entre las posiciones T41-I42, coincidente con los resultados de Paschal y col. (Paschal, Obar et al. 1989). Esto es coherente con el corte entre las posiciones K40-T41 producido por endopeptidasa Lys-C. En la proteína ensamblada en microtúbulos de taxol aumenta la intensidad de la banda de TH α 1, esto podría deberse a una mayor sensibilidad de este punto de corte si bien la intensidad de la banda de α -tubulina sin digerir no se reduce en igual medida. Probablemente este aumento se deba también a una menor actividad (ligeramente menor) en los otros puntos de corte (ver abajo) de forma que se acumule TH α 1.

La banda TH α 2/TH α 3 reacciona con todos los anticuerpos disponibles frente a α -tubulina. Se ha interpretado que en esta banda hay dos péptidos, TH α 2 y TH α 3.

TH α 2 está generado por un único corte en la región 280-300. TH α 4 está relacionado con este fragmento, se forma por el corte secundario de TH α 2 en las posiciones T41-I42. El punto de corte, en la región 280-300, que genera ambos péptidos es igual ya que sólo se observa un único fragmento, TH α 5, correspondiente a la región carboxilo terminal.

TH α 3 reacciona con los anticuerpos específicos de la región carboxilo terminal de la α -tubulina, y del epítipo α (214-226). No es posible determinar si contiene también el epítipo α (155-168) ya que migra junto con TH α 2 que si reacciona con el anticuerpo frente a este epítipo. Por el peso molecular aparente de este fragmento el punto de corte debe estar situado en torno a la posición 175.

El la forma polimerizada la sensibilidad de estos dos puntos de corte no cambia significativamente.

Cadena β .

La proteólisis controlada de β -tubulina por termolisina genera un mapa peptídico complejo (al menos 12 péptidos). Se ha interpretado que la digestión se produce en dos zonas de la proteína, existiendo varios puntos de corte en cada una de ellas.

Una esta situada en la región contigua superior al epítipo β (153-165), en ella parece haber tres puntos de corte. Se han localizado a este lado del epítipo por la reactividad de los péptidos TH β 9, TH β 11 y TH β 12, que son reconocidos por los anticuerpos frente a β (1-13) y β (153-165). Los fragmentos complementarios de estos cortes son TH β 6, TH β 4 y TH β 1 respectivamente.

La segunda región sensible esta comprendida entre los residuos 260 a 310, existen tres puntos de corte en esta región que producen las siguientes parejas de fragmentos: TH β 5 con TH β 7, TH β 3 con TH β 8 y TH β 2 con TH β 10.

La proteólisis limitada de la cadena β no se modifica en la tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol.



Figura 24. Proteólisis limitada con termolisina 1,5% de tubulina en forma dimérica (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19) y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20) en tampón 10 mM NaPi, 6 mM MgCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.7. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 20) inmunodetección con los anticuerpos: anti α -tubulina acetilada en Lys40 (calles 3 y 4), anti α (155-168) (calles 5 y 6), anti α (214-226) (calles 7 y 8), anti α (415-443) (calles 9 y 10), anti α -tubulina tirosinada (calles 11 y 12), anti β (1-13) (calles 13 y 14), anti β (153-165) (calles 15 y 16), anti β (241-256) (calles 17 y 18) y anti β (412-431) (calles 19 y 20). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular, en kD.

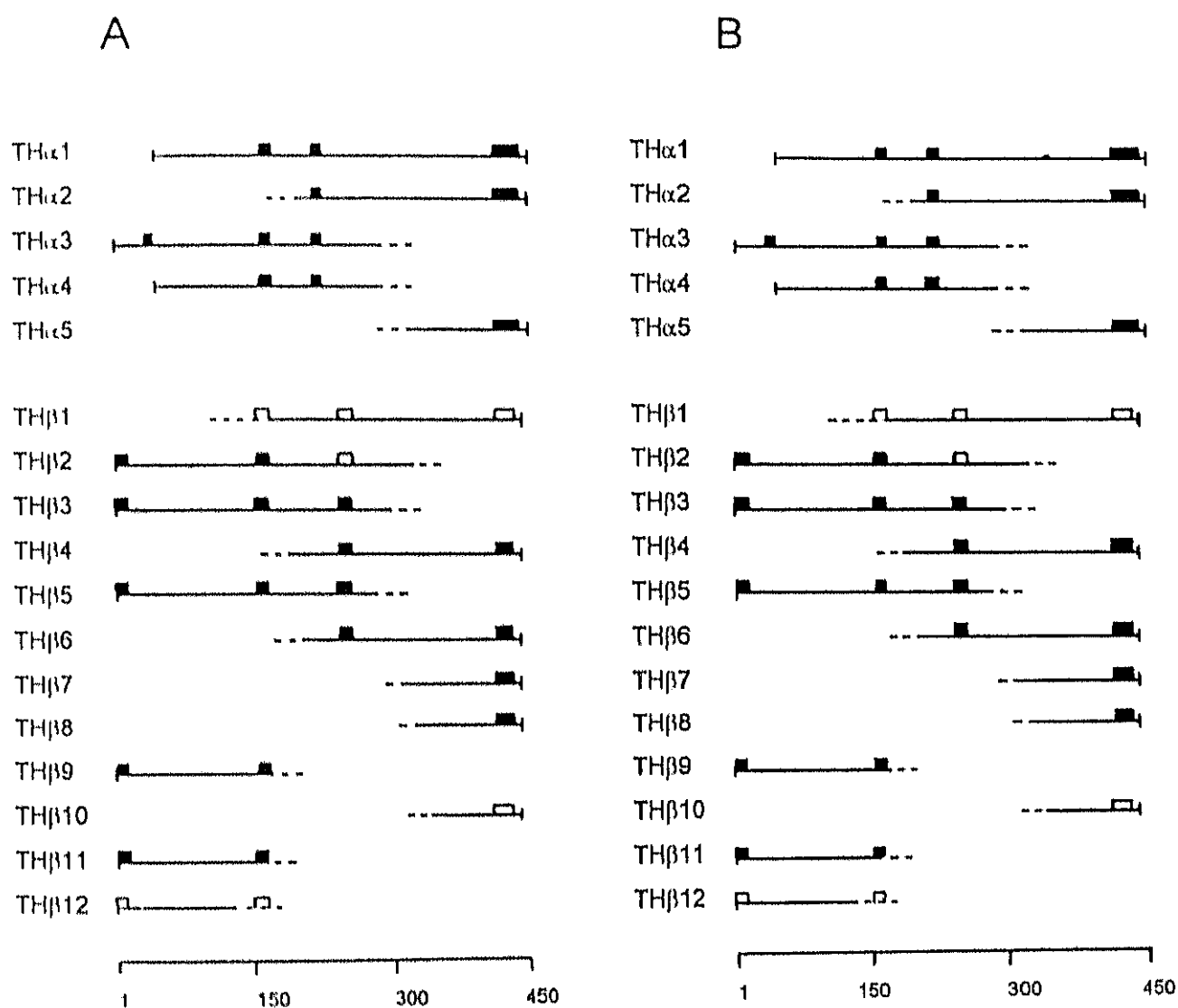


Figura 25. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con termolisina de tubulina dimérica (A) y tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítopos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

Tabla 16. Fragmentos de proteolisis limitada de tubulina con Termolisina 1.5% (p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
TH α 1	57.0 \pm 2.0	45.1 \pm 2.0	⁴² I GGxDDxF	42 a 451	45578
TH α 2	38.4 \pm 1.3	30.6 \pm 1.3	n.d.	177 \pm 10 a 451	n.d.
TH α 3	38.4 \pm 1.3	33.5 \pm 1.3	n.d.	1 a 302 \pm 10	n.d.
TH α 4	34.7 \pm 1.2	30.7 \pm 1.2	n.d.	42 a 317 \pm 10	n.d.
TH α 5	19.7 \pm 0.7	16.1 \pm 0.7	n.d.	307 \pm 10 a 451	n.d.
TH β 1	41.1 \pm 1.4	36.6 \pm 1.4	n.d.	120 \pm 10 a 445	n.d.
TH β 2	40.2 \pm 1.4	37.3 \pm 1.4	n.d.	1 a 336 \pm 10	n.d.
TH β 3	37.5 \pm 1.3	34.8 \pm 1.3	n.d.	1 a 315 \pm 10	n.d.
TH β 4	37.5 \pm 1.3	32.8 \pm 1.3	n.d.	156 \pm 10 a 445	n.d.
TH β 5	36.4 \pm 1.3	33.8 \pm 1.3	n.d.	1 a 306 \pm 10	n.d.
TH β 6	36.4 \pm 1.3	31.7 \pm 1.3	n.d.	166 \pm 10 a 445	n.d.
TH β 7	23.3 \pm 0.8	17.8 \pm 0.8	n.d.	290 \pm 5 a 445	n.d.
TH β 8	21.9 \pm 0.8	16.3 \pm 0.8	n.d.	303 \pm 5 a 445	n.d.
TH β 9	20.6 \pm 0.7	19.2 \pm 0.7	n.d.	1 a 176 \pm 6	n.d.
TH β 10	19.5 \pm 0.7	13.8 \pm 0.7	n.d.	325 \pm 5 a 445	n.d.
TH β 11	18.8 \pm 0.6	17.6 \pm 0.6	n.d.	1 a 162 \pm 5	n.d.
TH β 12	15.6 \pm 0.5	14.6 \pm 0.5	n.d.	1 a 133 \pm 5	n.d.

1.8. PROTEOLISIS LIMITADA CON PROTEASA V8.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol, producido por proteasa V8 2% (p/p) se muestra en la figura 26. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 27, y sus características se indican en la tabla 17.

Cadena α :

El mapa peptídico de α -tubulina digerida con proteasa V8 es producido por la proteólisis en tres regiones.

Existe un punto de corte cerca del extremo carboxilo. Este corte no elimina la reactividad frente al anticuerpo anti α (415-445) pero sí frente al anticuerpo que reconoce α -tubulina tirosinada.

Se ha secuenciado el extremo amino del péptido mayoritario V8 α 1, localizándose el punto de corte entre las posiciones E168-F169. El fragmento V8 α 2 tiene un PM aparente ligeramente inferior a V8 α 1, y no reacciona con el anticuerpo anti α -tubulina tirosinada. Luego se produce por una doble digestión en los puntos descritos con anterioridad: entre E168-F169 y cerca del extremo carboxilo.

Los péptidos V8 α 6 y V8 α 7 son complementarios del corte en E168-F169. Esta duplicidad no se explica con un único corte, luego hay un corte posterior bien cerca del extremo amino o cerca de la posición 168. Si se tratara de un corte cerca del extremo amino o bien sólo se produce sobre V8 α 6 una vez originado por el corte entre E168-F169; o bien está localizado tan próximo al extremo amino que no permite apreciar la duplicación de las bandas de α -tubulina y V8 α 3. Cerca y anterior a la posición 168 el único residuo ácido es D160 (figura 28A). Un punto de corte entre las posiciones D160-Y161 afectaría a la integridad del epítipo α (153-165). La región restante del epítipo justificaría la reactividad de V8 α 2 con el suero anti α (153-165).

Un tercer punto de corte se produce entre los residuos E290-I291, tal como se deduce de la secuencia amino terminal del péptido V8 α 4. De manera análoga a como se produce V8 α 2 a partir de V8 α 1, el fragmento V8 α 5 es producido por una doble proteólisis: en esta posición y junto al extremo carboxilo, que explica la falta de reactividad con el anticuerpo

1A2. De estos péptidos sólo se detecta un fragmento complementario, V8 α 3, correspondiente a la secuencia α (1-290).

El mapa peptídico de la tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol es similar al de la forma dimérica. Se observa una reducción del corte localizado cerca del extremo carboxilo, con un ligero aumento de la presencia del fragmento V8 α 4 a expensas de una disminución de V8 α 5.

Cadena β :

La proteólisis controlada de β -tubulina con proteasa V8 se produce principalmente junto al extremo carboxilo. Hay tres bandas con movilidad electroforética ligeramente inferior a la de la β -tubulina, por lo que al menos debe haber tres puntos de corte en esta región. Por la reactividad frente al anticuerpo anti β (412-431) se han localizado: un primer punto de corte en la región anterior al residuo 412 o inmediatamente posterior, origina el péptido V8 β 3 que no es reconocido por el anticuerpo anti β (412-431). El segundo corte no afecta totalmente a la integridad del epítipo β (412-431) ya que el fragmento V8 β 2 reacciona débilmente con el anticuerpo que lo reconoce. El tercer punto de corte debe localizarse en la región 431-445, ya que el fragmento V8 β 1 parece contener íntegro el epítipo β (412-431).

Se observa un cuarto punto de corte en la cadena β que genera el fragmento V8 β 4, no se observa el fragmento complementario correspondiente. A partir del PM aparente (37.5kD) y corregido (34.8kD) de este fragmento el punto de corte debe localizarse en torno a la posición 315. Los residuos ácidos, Glu y Asp, que se encuentran en esta región y participan potencialmente en este corte son: D295, D304, E325 y E328 (figura 28B). No se detecta la presencia de ningún fragmento complementario de V8 β 4.

La sensibilidad de estos puntos de corte es similar en la tubulina polimerizada en microtúbulos de taxol.

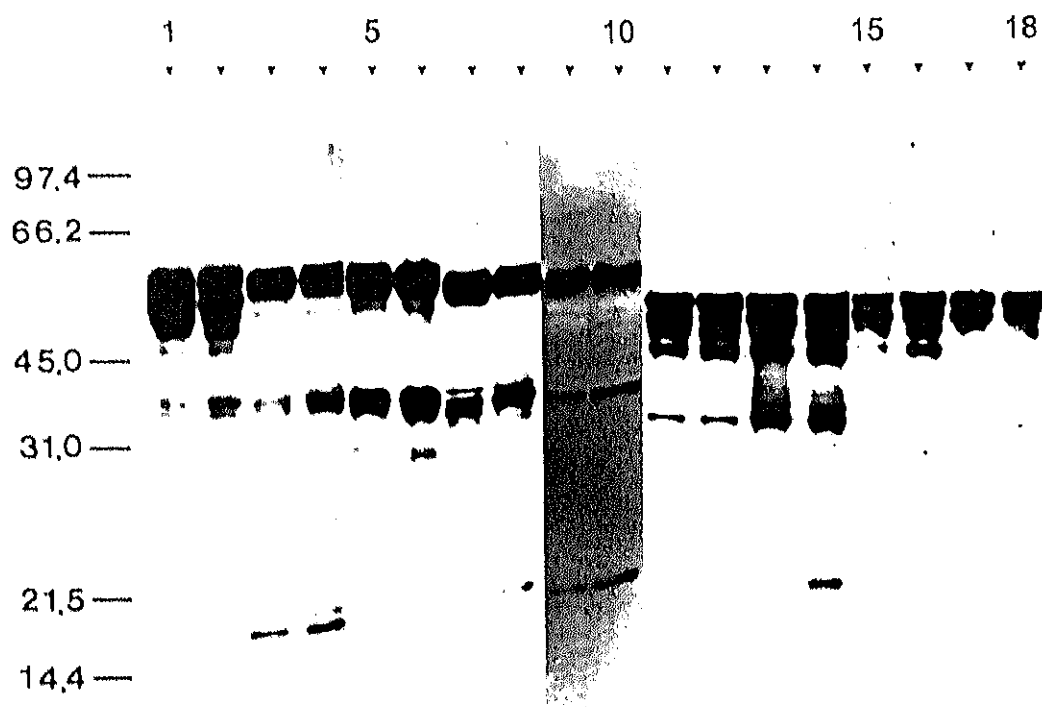


Figura 26. Proteólisis limitada con V8 2% de tubulina en forma dimérica (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17) y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18) en tampón 10 mM NaPi, 6 mM $MgCl_2$, 1 mM GTP, pH 6.7. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 18) inmunodetección con los anticuerpos: anti α (155-168) (calles 3 y 4), anti α (214-226) (calles 5 y 6), anti α (415-443) (calles 7 y 8), anti α -tubulina tirosinada (calles 9 y 10), anti β (1-13) (calles 11 y 12), anti β (153-165) (calles 13 y 14), anti β (241-256) (calles 15 y 16) y anti β (412-431) (calles 17 y 18). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular, en kD.

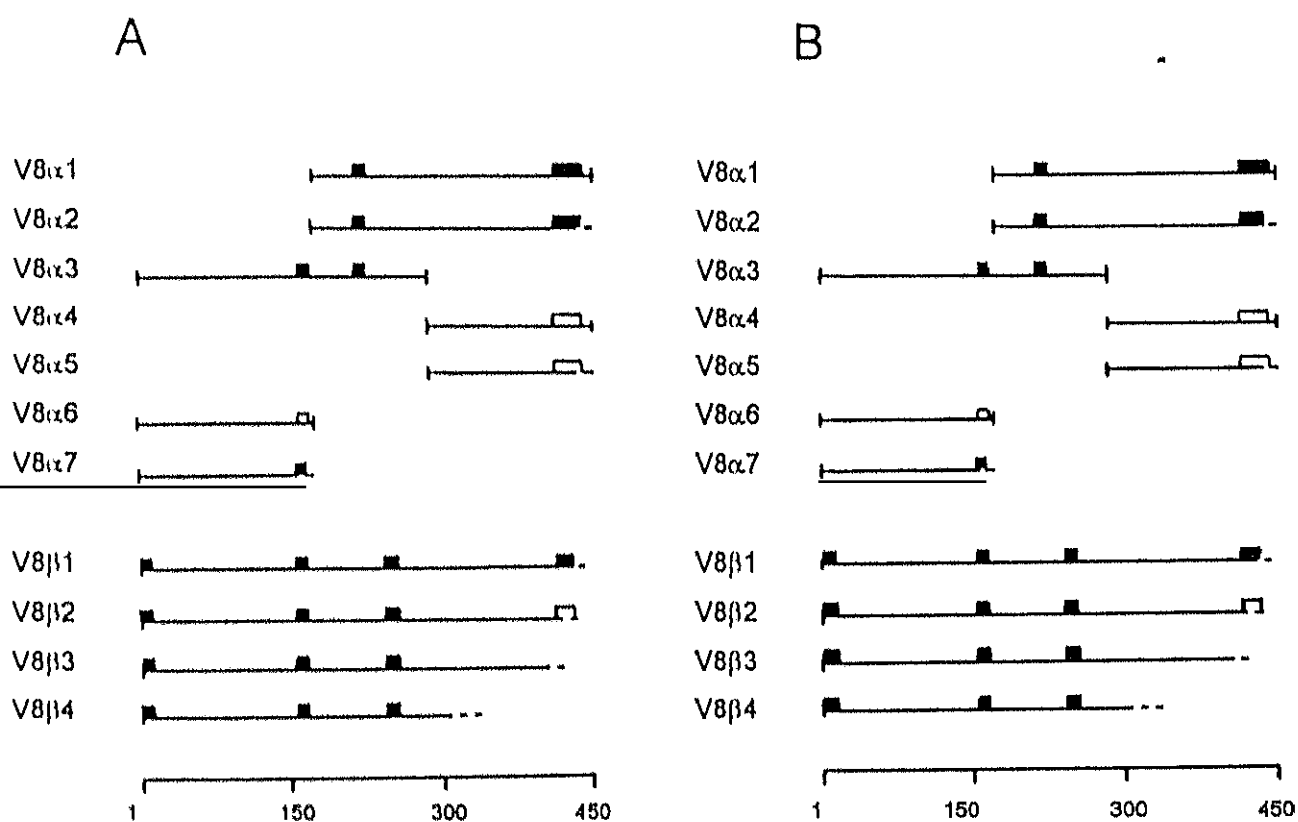


Figura 27. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con proteasa V8 de tubulina dimérica (A) y tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítopos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

A	150	160	170	180		
aa	TSLIMERLSVDYGKKSKLEFSIYPAPQVSTA					
B	290	300	310	320	330	340
aa	TQQMFDAKNMMAACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKSSY					

Figura 28. Secuencia de la región 150-180 de α -tubulina (A) y 290-340 de β -tubulina (B) de cerebro porcino. Se ha subrayado la región correspondiente al epítipo α (155-168). En negrilla se indican los residuos de Asp y Glu, potenciales puntos de proteólisis limitada de la proteinasa V8.

Tabla 17. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina con Proteasa V8 2% (p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
V8 α 1	39.6 \pm 1.4	31.6 \pm 1.4	¹⁶⁹ FxIYPAPQ	169 a 451	31676
V8 α 2	38.7 \pm 1.3	30.9 \pm 1.3	n.d.	169 a 444 \pm 7	n.d.
V8 α 3	38.7 \pm 1.3	33.7 \pm 1.3	n.d.	1 a 290	32082
V8 α 4	20.4 \pm 0.7	16.6 \pm 0.7	²⁹¹ ITxAAFEP	291 a 451	18014
V8 α 5	19.5 \pm 0.7	15.9 \pm 0.7	n.d.	291 a 432 \pm 5	n.d.
V8 α 6	18.7 \pm 0.7	18.4 \pm 0.7	n.d.	1 a 168	18420
V8 α 7	17.7 \pm 0.6	17.7 \pm 0.6	n.d.	1 a 162 \pm 5	n.d.
V8 β 1	52.0 \pm 1.8	48.1 \pm 1.8	n.d.	1 a 430 \pm 10	n.d.
V8 β 2	50.0 \pm 1.7	46.3 \pm 1.7	n.d.	1 a 414 \pm 10	n.d.
V8 β 3	48.0 \pm 1.7	44.5 \pm 1.7	n.d.	1 a 399 \pm 10	n.d.
V8 β 4	37.5 \pm 1.3	34.8 \pm 1.3	n.d.	1 a 315 \pm 10	n.d.

1.9. PROTEOLISIS LIMITADA CON PAPAÑA.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol, producido por papaña 1% (p/p) se muestra en la figura 29. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 30, y sus características se indican en la tabla 18.

Cadena α :

La papaña digiere la α -tubulina aparentemente en tres puntos de corte.

El punto de proteolisis mayoritario genera la pareja de péptidos $PA\alpha 3$ y $PA\alpha 2$, y se localiza entre las posiciones S178-T179. El fragmento $PA\alpha 2$ no es reconocido por el anticuerpo 1A2, anti α -tubulina tirosinada, indicando la presencia de un segundo punto de digestión próximo al extremo carboxilo. La ausencia de duplicidad de bandas debido a este corte indica que se localiza muy próximo al final de la cadena polipeptídica, y no se resuelven en la electroforesis los fragmentos intacto y digerido en esta posición. En la α -tubulina ensamblada en microtúbulos de taxol el fragmento TX- $PA\alpha 1$, equivalente a $PA\alpha 2$, si es reconocido por el anticuerpo 1A2, luego este punto de corte se protege durante la polimerización.

El segundo punto de corte produce el fragmento $PA\alpha 1$, pero no se observa ningún péptido de bajo PM aparente que pueda ser complementario de este corte. A partir del PM aparente el corte se produce en la región 300-320.

Los dos puntos de corte internos se mantienen accesibles en los microtúbulos inducidos por taxol.

Cadena β :

La papaña digiere la β -tubulina en dos regiones.

La primera zona de corte se localiza en torno a la posición 170, secuencialmente posterior al eptopo β (153-165). Se detecta un único fragmento $PA\beta 3$ que contiene la región carboxilo de la tubulina. Por el contrario se detectan 3 fragmentos: $PA\beta 6$, $PA\beta 7$ y $PA\beta 8$ potencialmente complementarios de $PA\beta 3$. $PA\beta 8$ es el de menor PM aparente y el mayoritario de los tres. Como estos tres fragmentos conservan el extremo amino de la β -

tubulina intacto ya que son reconocidos por el anticuerpo anti $\beta(1-13)$, debe existir tres puntos de corte en esta región. La falta de multiplicidad de PA β 3 indica que los puntos de corte en posiciones más retrasadas se producen posteriormente a la primera digestión.

La segunda región sensible a papaína es la región 290-330. Se observan dos puntos de proteólisis que generan las siguientes parejas de fragmentos: PA β 1 con PA β 5 y PA β 2 con PA β 4.

Se observan cambios significativos en el mapa peptídico de la β -tubulina en la forma ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol.

Se detecta un nuevo fragmento, TX-PA β 1, con PM aparente ligeramente inferior al de la β -tubulina y que reacciona con los cuatro anticuerpos frente a β -tubulina empleados. A partir del peso molecular aparente corregido del fragmento el corte que lo produce se localiza en la región 421-439. Por contener el epítipo $\beta(412-431)$ se localiza con mayor probabilidad entre las posiciones 430-440.

Se observa un desdoblamiento de PA β 3, también presente, en dos nuevos fragmentos: TX-PA β 2 y TX-PA β 3. Estos dos fragmentos sólo reaccionan con el anticuerpo anti $\beta(412-431)$. Por analogía con el origen de TX-PA β 1, estos dos fragmentos se producen por sendos cortes en la región carboxilo terminal, en posiciones más avanzadas al epítipo $\beta(412-431)$ cuya integridad no comprometen.

Asimismo aparecen los fragmentos TX-PA β 4 de PM aparente ligeramente mayor que PA β 4 y PA β 5, y TX-PA β 5 y TX-PA β 6 de PM aparente inferior. A causa del mayor PM aparente de TX-PA β 4 respecto a PA β 4 debe haber a un desplazamiento hacia una posición secuencialmente anterior al corte en 290-330 que lo origina PA β 4. Este desplazamiento en la posición del corte debe ser pequeño, ya que no hay variación apreciable en la movilidad electroforética del fragmento complementario, PA β 1. TX-PA β 5 y TX-PA β 6 se generan por uno o dos cortes próximos al extremo carboxilo de la β -tubulina, de forma análoga a TX-PA β 2 y TX-PA β 3.

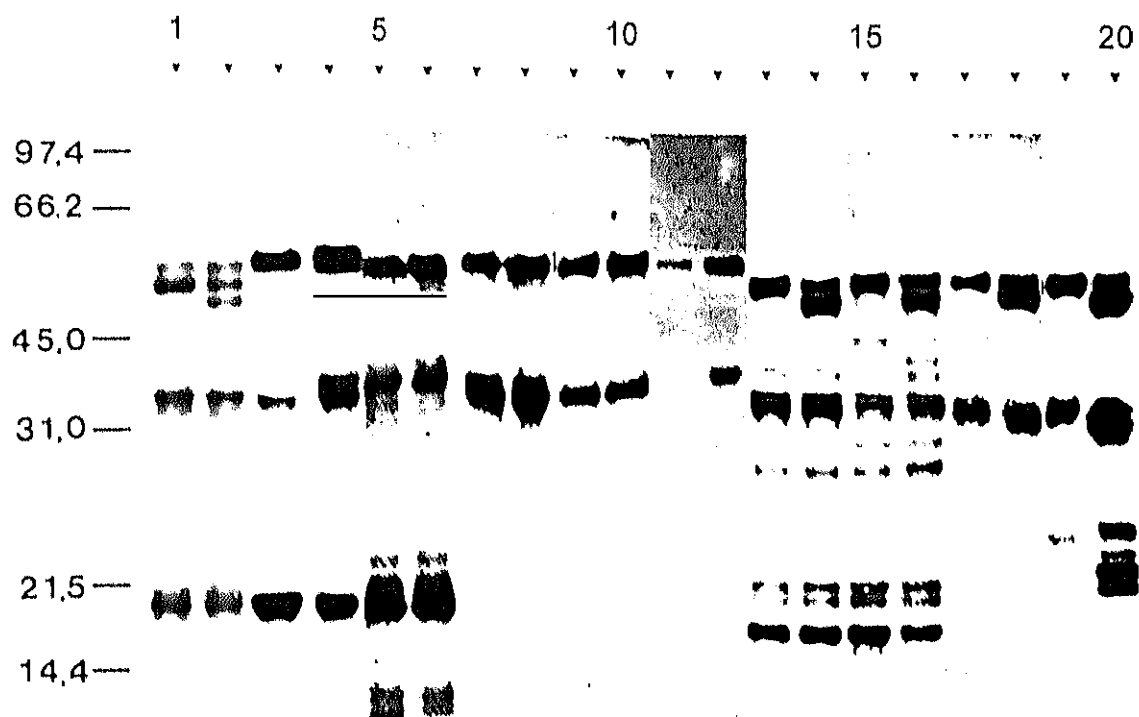


Figura 29. Proteólisis limitada con papaína 1% de tubulina en forma dimérica (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19) y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20) en tampón 10 mM NaPi, 6 mM MgCl₂, 1 mM GTP, pH 6.7. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 20) inmunodetección con los anticuerpos: anti α -tubulina acetilada en Lys40 (calles 3 y 4), anti α (155-168) (calles 5 y 6), anti α (214-226) (calles 7 y 8), anti α (415-443) (calles 9 y 10), anti α -tubulina tirosinada (calles 11 y 12), anti β (1-13) (calles 13 y 14), anti β (153-165) (calles 15 y 16), anti β (241-256) (calles 17 y 18) y anti β (412-431) (calles 19 y 20). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular, en kD.

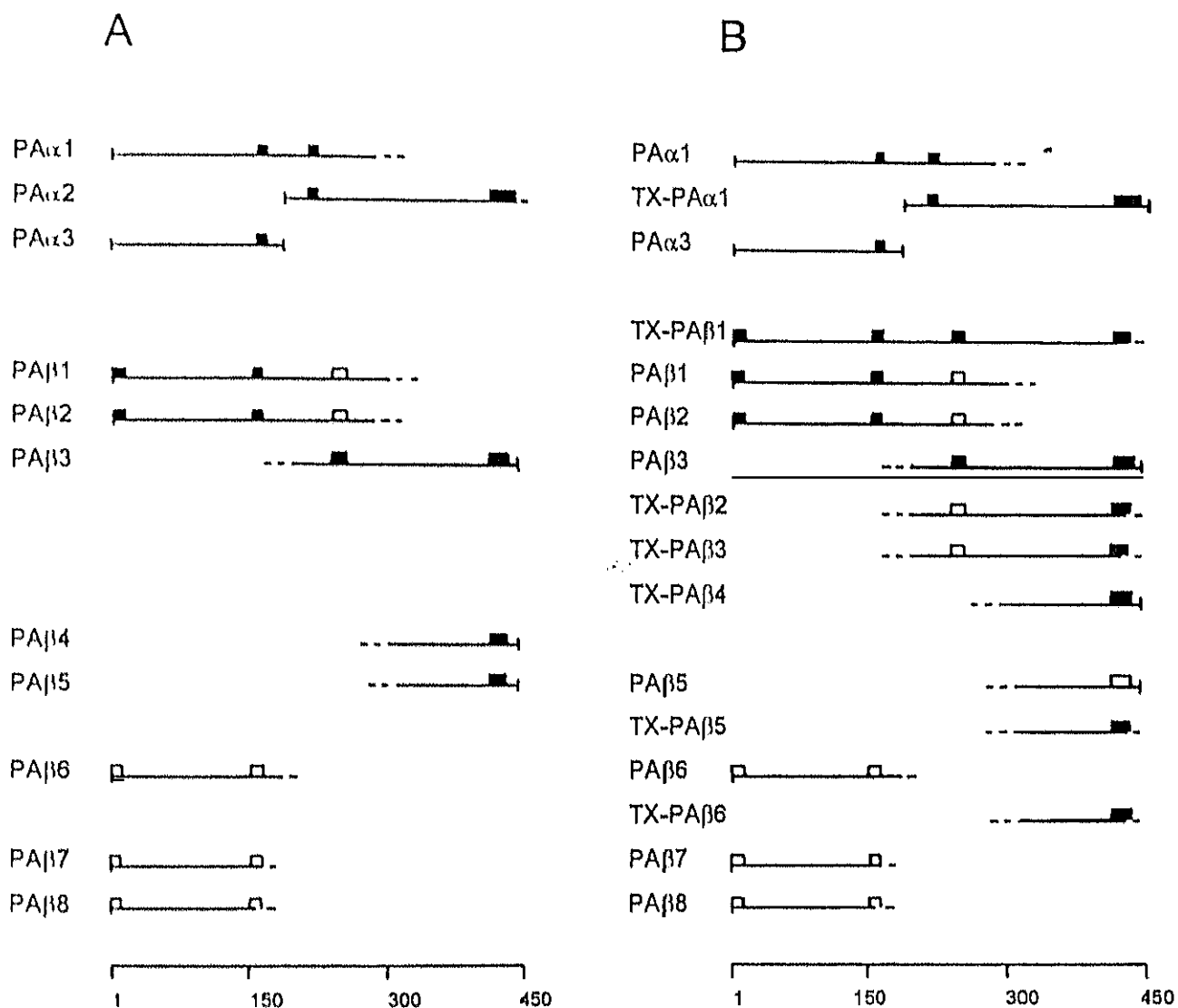


Figura 30. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con papaina de tubulina dimérica (A) y tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítomos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

Tabla 18. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina con Papaína 1% (p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
PA α 1	39.6 \pm 1.4	34.4 \pm 1.4	n.d.	1 a 312 \pm 10	n.d.
PA α 2	37.7 \pm 1.3	30.1 \pm 1.3	¹⁷⁰ XAVVEPY	179 a 445 \pm 5	n.d.
PA α 3	18.3 \pm 0.6	18.1 \pm 0.6	n.d.	1 a 179	19510
PA β 1	37.7 \pm 1.3	35.0 \pm 1.3	n.d.	1 a 317 \pm 10	n.d.
PA β 2	36.3 \pm 1.3	33.7 \pm 1.3	n.d.	1 a 305 \pm 10	n.d.
PA β 3	35.4 \pm 1.2	30.6 \pm 1.2	n.d.	176 \pm 9 a 445	n.d.
PA β 4	22.8 \pm 0.8	17.2 \pm 0.8	n.d.	295 \pm 6 a 445	n.d.
PA β 5	21.7 \pm 0.8	16.1 \pm 0.8	n.d.	305 \pm 5 a 445	n.d.
PA β 6	19.8 \pm 0.7	18.5 \pm 0.7	n.d.	1 a 170 \pm 6	n.d.
PA β 7	18.8 \pm 0.7	17.6 \pm 0.7	n.d.	1 a 162 \pm 6	n.d.
PA β 8	17.3 \pm 0.6	16.2 \pm 0.6	n.d.	1 a 150 \pm 5	n.d.
TX-PA α 1	37.7 \pm 1.3	30.1 \pm 1.3	n.d.	179 a 451	30585
TX-PA β 1	52.0 \pm 1.8	48.1 \pm 1.8	n.d.	1 a 430 \pm 9	n.d.
TX-PA β 2	33.8 \pm 1.2	28.9 \pm 1.2	n.d.	175 \pm 15 a 430 \pm 9	n.d.
TX-PA β 3	33.2 \pm 1.2	28.3 \pm 1.2	n.d.	175 \pm 15 a 422 \pm 5	n.d.
TX-PA β 4	23.4 \pm 0.8	17.9 \pm 0.8	n.d.	289 \pm 5 a 445	n.d.
TX-PA β 5	20.2 \pm 0.7	14.5 \pm 0.7	n.d.	289 \pm 5 a 440 \pm 5	n.d.
TX-PA β 6	18.9 \pm 0.7	13.1 \pm 0.7	n.d.	326 \pm 5 a 440 \pm 5	n.d.

1.10. PROTEOLISIS LIMITADA CON SUBTILISINA.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimerica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol, producido por subtilisina 0.7% (p/p) se muestra en la figura 31. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 32, y sus características se indican en la tabla 19.

Cadena α :

La proteólisis de α -tubulina por subtilisina se produce en 3 regiones de la molécula.

El fragmento SB α 1 tiene un PM aparente ligeramente inferior al de α -tubulina. Reacciona con el anticuerpo anti α (415-443), luego conserva este epítipo, pero no con el anticuerpo 1A2 específico de la forma tirosinada del extremo carboxilo de la cadena α . El corte que lo origina debe localizarse entre la región 415-443, cuya integridad no compromete, y el extremo carboxilo.

La subtilisina digiere la región carboxilo terminal de la α -tubulina en al menos un punto mayoritario, cuya localización varía según las condiciones. Por un lado se ha descrito que la posición del corte es sensible a concentraciones milimolares de cationes divalentes: Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} (Lobert, Hennington et al. 1993). Se observan dos localizaciones distintas de este punto mayoritario de proteólisis según se realice en tampón fosfato y baja concentración de Mg^{2+} , o en tampón MES o en alta concentración de Mg^{2+} (~6 mM). En este último caso, similar al de este trabajo, el producto de la digestión es reconocido por los anticuerpos anti- α (415-443) y anti- α (430-443), proponiendo que la digestión se produce entre los residuos E441-G442 o en sus proximidades (Arévalo y Andreu resultados sin publicar). Este resultado es compatible con el observado en el presente trabajo.

Redeker y col. han identificado el enlace D438-S439 como el punto de corte mayoritario producido por subtilisina en α -tubulina de cerebro porcino, en tampón 100 mM MES, 1 mM EGTA, 0.5 mM Mg^{2+} , 1 mM GTP (Redeker, Melki et al. 1992). Esta posición del corte también es compatible con los resultados de este trabajo, ya que la digestión sólo eliminaría 7 residuos del epítipo 415-443, lo que supone que el 70% del mismo permanecería en el fragmento SB α 1 que justifica el ser reconocido por su anticuerpo específico.

La digestión entre las posiciones A180-V181 origina los fragmentos SB α 8 y los complementarios SB α 2 y SB α 4. El fragmento SB α 4 se origina además por un segundo corte en la región carboxilo terminal de α -tubulina, probablemente SB α 4 corresponde al fragmento 181-438. Se observa un fragmento minoritario, SB α 6, de PM aparente ligeramente superior a SB α 8, hay dos posibles explicaciones para su origen. Que el punto de corte que lo origina este secuencialmente más avanzado que A180-V181. O bien que SB α 6 se origine en el corte A180-V181 y consecuentemente exponga un segundo punto de corte secuencialmente anterior que produzca y acumule el fragmento SB α 8.

La región 290-300 también es sensible a esta proteasa. Se detecta un único fragmento correspondiente al extremo amino de α -tubulina, SB α 3. Por el contrario hay 3 fragmentos con el extremo carboxilo de α -tubulina, SB α 5, SB α 7 y SB α 9. Por la reactividad con el anticuerpo 1A2 se ha interpretado que SB α 5 y SB α 7 se producen en el mismo corte interno, y SB α 7 también ha sido digerido cerca del extremo carboxilo. SB α 9 se produce en un punto de corte secuencialmente más avanzado.

El mapa peptídico producido por subtilisina es similar en la proteólisis limitada de la tubulina polimerizada en microtúbulos inducidos por taxol. Es apreciable un aumento en la intensidad de las bandas reconocidas por el anticuerpo 1A2, anti tubulina tirosinada. Hay una protección del punto de corte localizado en la región carboxilo terminal de α -tubulina.

Cadena β :

La proteólisis limitada de la β -tubulina se produce en tres regiones.

En la región 165-180 existen tres puntos de corte que generan los siguientes pares de fragmentos: SB β 12 con SB β 5, SB β 11 con SB β 7 y SB β 9 con SB β 8.

En la región 280-300 existen dos puntos de corte. Uno origina los fragmentos SB β 4 y su complementario SB β 10. Otro produce el fragmento SB β 6, no se detecta el fragmento complementario. SB β 10 está prácticamente ausente en la muestra de la digestión de tubulina ensamblada, indicando la protección del punto de corte que lo genera.

En las proximidades del extremo carboxilo existen al menos tres puntos sensibles a subtilisina. El punto mayoritario de digestión en esta zona genera el fragmento SB β 1. En las condiciones ensayadas la proteólisis en este punto es total, y no se detecta presencia de β -

tubulina intacta. Por lo tanto los fragmentos SB β 5, SB β 7, SB β 8 y SB β 10, no conservan íntegro el extremo carboxilo de β -tubulina. De acuerdo con la reactividad inmunológica de SB β 1, la digestión se produce más adelante de la posición 431. A partir de la determinación del número de tirosinas perdidas en el corte por el fragmento de mayor peso molecular, se ha propuesto que este se localiza entre los residuos E421-Y422 o en sus proximidades. La zona β (412-421) restante justifica la reactividad con el anticuerpo anti- β (412-431) (Arévalo y Andreu, resultados sin publicar).

Redeker y col. han identificado en el enlace Q433-G434 el punto mayoritario de digestión de β -tubulina de cerebro porcino por subtilisina. Esta localización también es compatible con la propuesta para el punto de corte mayoritario observado en este trabajo, ya que no elimina el epítipo β (412-431) del fragmento SB β 1. En las condiciones empleadas por estos autores, 30° C y 1% (p/p) subtilisina/tubulina, la digestión en esta posición es completa en los 5 primeros minutos de la reacción (Redeker, Melki et al. 1992).

Con los anticuerpos anti β (1-13) y anti β (153-165) se detectan dos bandas minoritarias: SB β 2 y SB β 3, de PM aparente ligeramente inferior a SB β 1. Corresponden a los fragmentos originados por dos cortes en la región carboxilo secuencialmente más retrasadas que el que genera SB β 1. Redeker y col. (Redeker, Melki et al. 1992) han identificado un punto de digestión minoritario entre las posiciones H396-W397. La multiplicidad en los fragmentos carboxilo-terminal, SB β 5, SB β 7, SB β 8 y SB β 10, no se detecta por carecer de los epítopos β (1-13) o β (153-165).

A parte de la protección del punto de corte en la región 280-300, el patrón de proteólisis limitada de β -tubulina digerida con subtilisina es similar para la proteína dimérica y polimerizada en microtúbulos inducidos por taxol.

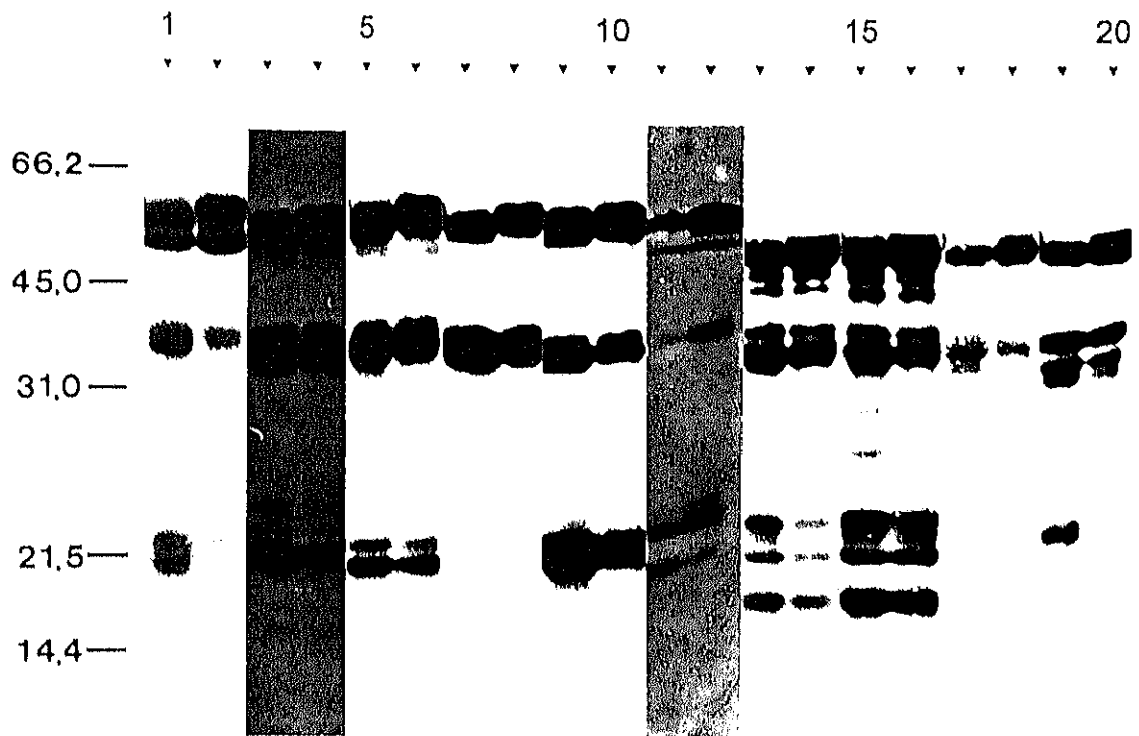


Figura 31. Proteólisis limitada con subtilisina 0.7% de tubulina en forma dimerica (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19) y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20) en tampón 10 mM NaPi, 6 mM MgCl₂, 1 mM GTP, pH 6.7. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 20) inmunodetección con los anticuerpos: anti α -tubulina acetilada en Lys40 (calles 3 y 4), anti α (155-168) (calles 5 y 6), anti α (214-226) (calles 7 y 8), anti α (415-443) (calles 9 y 10), anti α -tubulina tirosinada (calles 11 y 12), anti β (1-13) (calles 13 y 14), anti β (153-165) (calles 15 y 16), anti β (241-256) (calles 17 y 18) y anti β (412-431) (calles 19 y 20). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular, en kD.

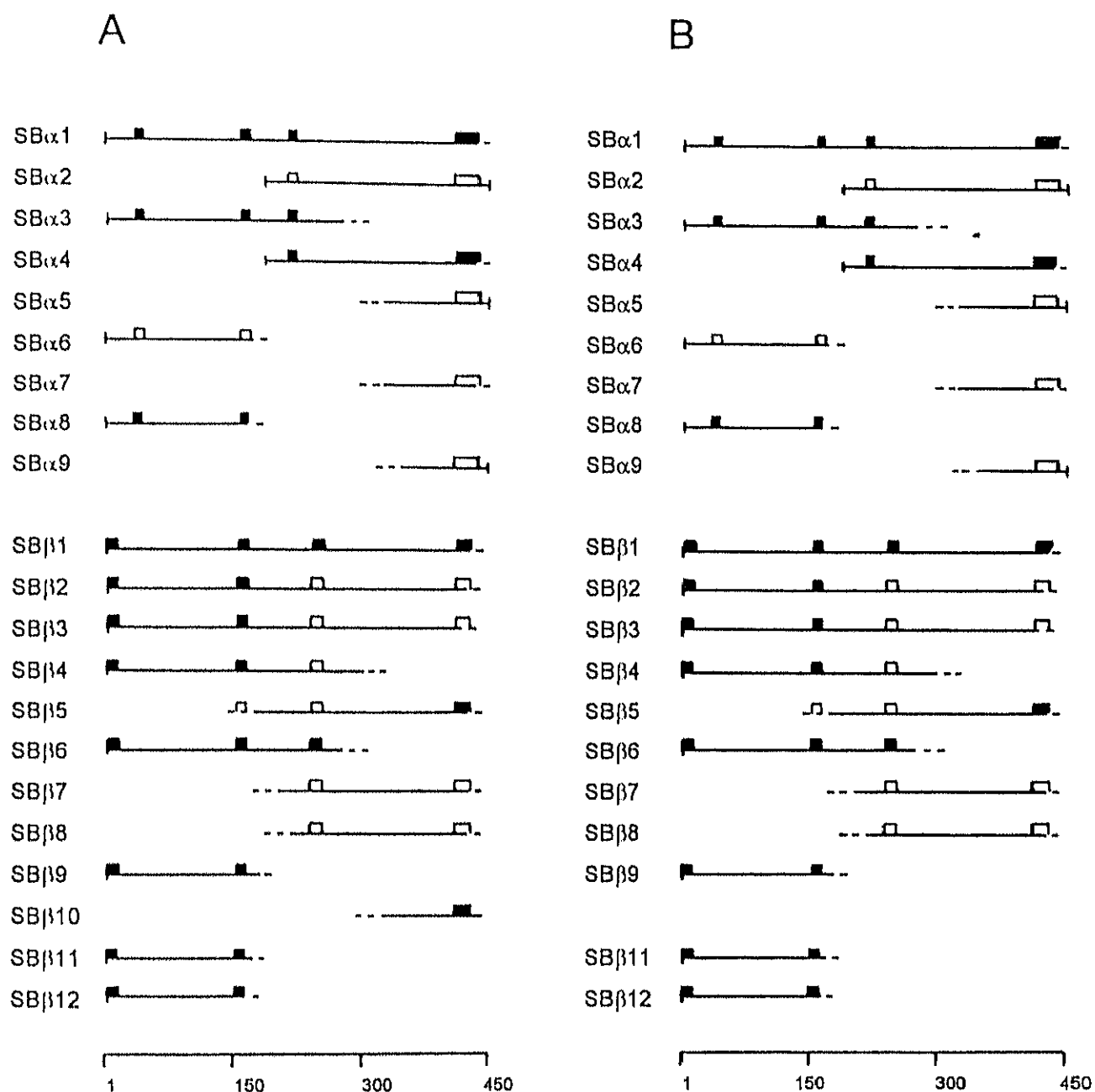


Figura 32. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con subtilisina de tubulina dimérica (A) y tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítopos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

Tabla 19. Fragmentos de proteolisis limitada de tubulina con Subtilisina 0.7% (p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
SB α 1	57.0 \pm 2.0	47.7 \pm 2.0	n.d.	1 a 430 \pm 10	48653 ^a
SB α 2	38.6 \pm 1.4	30.8 \pm 1.4	n.d.	181 a 451	30413
SB α 3	36.8 \pm 1.3	32.3 \pm 1.3	¹ MRExIxxH	1 a 292 \pm 8	n.d.
SB α 4	36.8 \pm 1.3	29.4 \pm 1.3	¹⁸¹ IxxEPYNSI	181 a 441 \pm 9	29009 ^b
SB α 5	19.9 \pm 0.7	16.2 \pm 0.7	n.d.	306 \pm 6 a 451	n.d. ^c
SB α 6	19.2 \pm 0.7	18.8 \pm 0.7	n.d.	1 a 172 \pm 5	n.d.
SB α 7	18.6 \pm 0.6	15.2 \pm 0.6	n.d.	297 \pm 18 a 435 \pm 15	n.d.
SB α 8	18.2 \pm 0.6	18.1 \pm 0.6	n.d.	1 a 165 \pm 5	n.d.
SB α 9	17.7 \pm 0.6	14.5 \pm 0.6	n.d.	320 \pm 6 a 451	n.d.
SB β 1	51.4 \pm 1.8	47.6 \pm 1.8	n.d.	1 a 426 \pm 10	48452 ^c
SB β 2	48.2 \pm 1.7	44.6 \pm 1.7	n.d.	1 a 400 \pm 10	n.d.
SB β 3	45.1 \pm 1.6	41.8 \pm 1.6	n.d.	1 a 376 \pm 10	n.d.
SB β 4	39.1 \pm 1.4	36.3 \pm 1.4	n.d.	1 a 328 \pm 8	n.d.
SB β 5	39.1 \pm 1.4	34.5 \pm 1.4	n.d.	124 \pm 10 a c.a.430	n.d.
SB β 6	35.8 \pm 1.3	33.2 \pm 1.3	n.d.	1 a 301 \pm 9	n.d.
SB β 7	32.4 \pm 1.1	27.4 \pm 1.1	n.d.	189 \pm 10 a c.a.430	n.d.
SB β 8	30.7 \pm 1.1	25.6 \pm 1.1	n.d.	205 \pm 10 a c.a.430	n.d.
SB β 9	19.4 \pm 0.7	18.1 \pm 0.7	n.d.	1 a 166 \pm 5	n.d.
SB β 10	17.4 \pm 0.6	11.5 \pm 0.6	n.d.	331 \pm 5 a c.a.430	n.d.
SB β 11	16.8 \pm 0.6	15.7 \pm 0.6	n.d.	1 a 144 \pm 6	n.d.
SB β 12	14.4 \pm 0.5	13.5 \pm 0.5	n.d.	1 a 123 \pm 5	n.d.

^a Suponiendo que SB α 1 corresponde a α (1-438).

^b Suponiendo que SB α 4 corresponde a α (181-438).

^c Suponiendo que SB β 1 corresponde a β (1-433).

1.11. PROTEOLISIS LIMITADA CON PROTEINASA K.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol, producido por proteinasa K 0.1% (p/p) se muestra en la figura 33. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 34, y sus características se indican en la tabla 20.

Cadena α :

La proteinasa K digiere la α -tubulina en tres puntos.

En la región 170-190 la digestión origina el fragmento K α 6 con dos fragmentos complementarios: K α 2 y K α 3. Estos dos últimos no son reconocidos por el anticuerpo anti α (214-226). Puede ser que este epítopo se destruya con la digestión, se bien a partir de sus PM aparentes el corte se localiza en una posición anterior.

Un segundo punto de corte interno se produce en la región 280-290. En él se origina el fragmento K α 1 y dos péptidos complementarios K α 4 y K α 5.

La reactividad con el anticuerpo 1A2, anti α -tubulina tirosinada, pone de manifiesto la naturaleza de las parejas K α 2/K α 3 y K α 4/K α 5. En ambos casos los segundos no son reconocidos por 1A2. K α 3 y K α 5 han perdido el extremo carboxilo a causa de un corte que no compromete la integridad del epítopo α (415-443).

Cadena β :

La proteinasa k digiere la β -tubulina en tres regiones.

Se detecta un fragmento de PM aparente 52 kD, K β 1, ligeramente inferior al de la β -tubulina sin digerir. Es reconocido por todos los anticuerpos frente a β -tubulina empleados. El corte que lo origina se localiza entre el epítopo β (412-431), cuya integridad no compromete, y el extremo carboxilo de la proteína. La proteinasa K digiere preferentemente enlaces peptídicos en los que el grupo carboxilo es aportado por un aminoácido hidrofóbico o aromático. El estudio de la secuencia de β -tubulina en la región del corte pone de manifiesto la presencia de un único residuo, Phe436, que satisface la especificidad de la enzima (figura 35). En base a esta selectividad se ha localizado el punto de corte entre F436-E437. Este corte explica la duplicidad de otras bandas (ver abajo).

Los fragmentos K β 3 y K β 5 de PM aparente 36.9 y 33.7 kD respectivamente, solo reaccionan con el anticuerpo frente a β (412-431). De forma análoga a K β 1, K β 5 ha sufrido un corte cerca del extremo carboxilo, entre F436-E437. Luego K β 3 y K β 5 se originan por el mismo corte localizado en la región 160-170.

Una tercera zona de β -tubulina sensible a proteinasa K es 290-315. K β 2 y K β 4 son dos fragmentos que conservan el extremo amino de β -tubulina, luego debe existir dos puntos de corte en la región propuesta. Como fragmentos complementarios de estos cortes se detectan dos: K β 6 y K β 7. La presencia de dos bandas complementarias es compatible con la existencia de dos puntos de corte en 290-315. El corte cerca del extremo carboxilo debería producir una duplicidad de las bandas K β 6 y K β 7 que no se detecta.

No se observan diferencias apreciables en el patrón de proteólisis limitada de α - o β -tubulina cuando están ensambladas en microtúbulos inducidos por taxol.

	410	420	430	440	445
aa	EAFESNMNDLVSEYQQYQDATADEQGEFEEEGEEDEA				

Figura 35. Secuencia de la región 410-445 de β -tubulina de cerebro porcino. Se ha subrayado la región correspondiente al epítipo β (412-431). En negrilla se indican el residuo de Phe436, potencial punto de digestión de la proteinasa K.

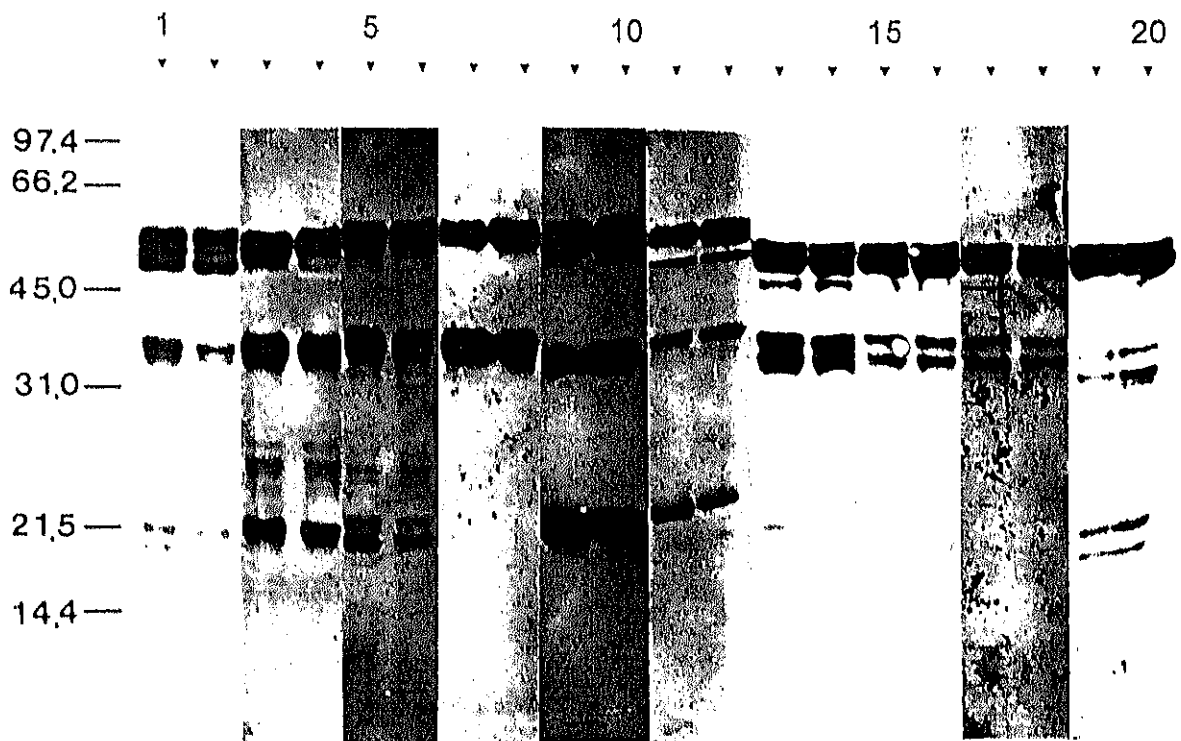


Figura 33. Proteólisis limitada con proteinasa K 0.1% de tubulina en forma dimérica (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19) y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20) en tampón 10 mM NaPi, 6 mM MgCl₂, 1 mM GTP, pH 6.7. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 20) inmunodetección con los anticuerpos: anti α -tubulina acetilada en Lys40 (calles 3 y 4), anti α (155-168) (calles 5 y 6), anti α (214-226) (calles 7 y 8), anti α (415-443) (calles 9 y 10), anti α -tubulina tirosinada (calles 11 y 12), anti β (1-13) (calles 13 y 14), anti β (153-165) (calles 15 y 16), anti β (241-256) (calles 17 y 18) y anti β (412-431) (calles 19 y 20). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular, en kD.

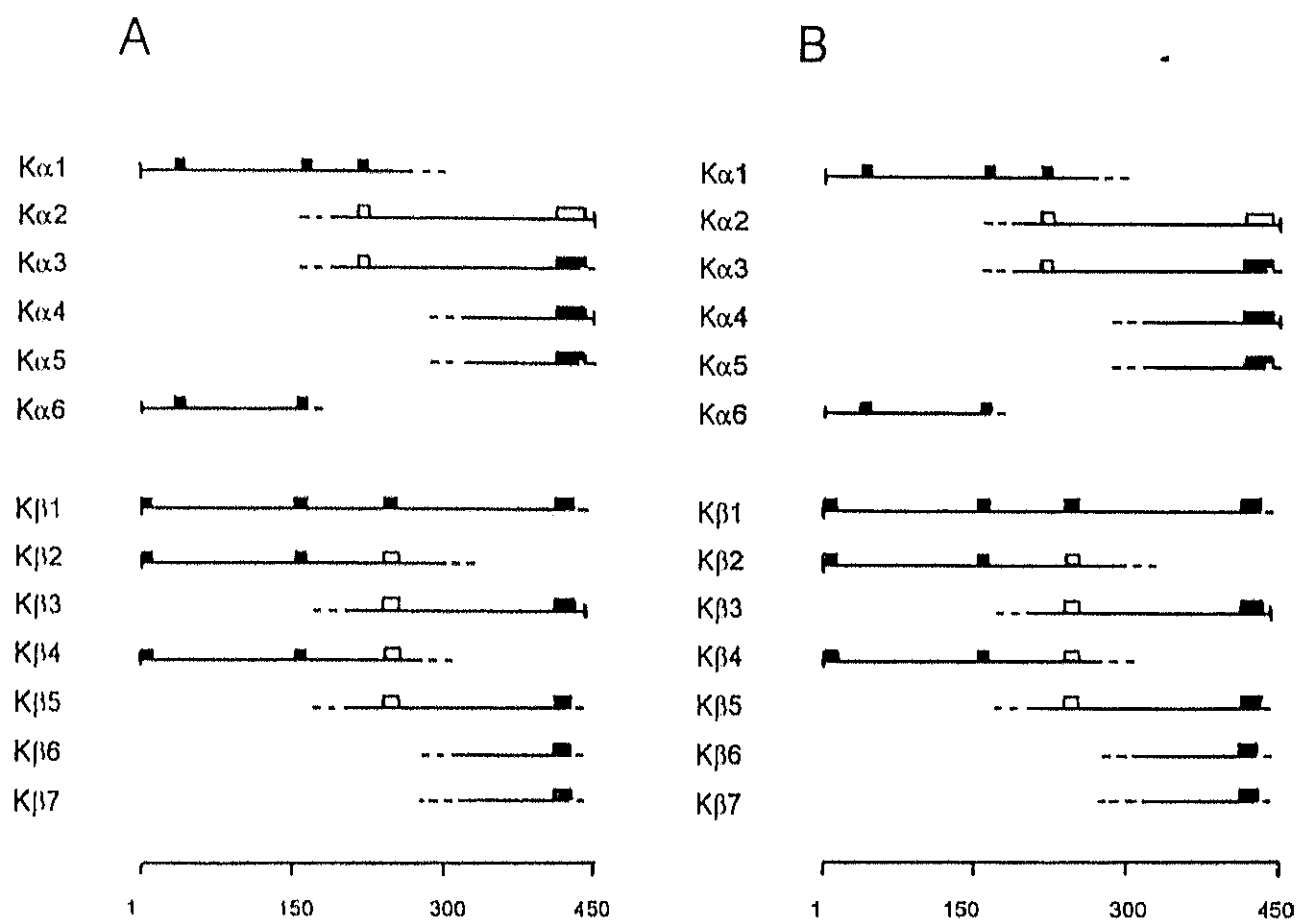


Figura 34. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con proteínasa K de tubulina dimérica (A) y tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítomos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

Tabla 20. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina con Proteinasa K 0.1% (p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
K α 1	37.8 \pm 1.3	33.0 \pm 1.3	n.d.	1 a 299 \pm 9	n.d.
K α 2	37.8 \pm 1.3	30.2 \pm 1.3	n.d.	180 \pm 9 a 451	n.d.
K α 3	36.0 \pm 1.3	28.8 \pm 1.3	n.d.	188 \pm 9 a c.a. 445	n.d.
K α 4	20.1 \pm 0.7	16.4 \pm 0.7	n.d.	304 \pm 5 a 451	n.d.
K α 5	19.1 \pm 0.7	15.6 \pm 0.7	n.d.	304 \pm 5 a c.a. 445	n.d.
K α 6	17.7 \pm 0.6	17.7 \pm 0.6	n.d.	1 a 162 \pm 5	n.d.
K β 1	52.0 \pm 1.8	48.1 \pm 1.8	n.d.	1 a 436	48779
K β 2	39.1 \pm 1.4	36.3 \pm 1.4	n.d.	1 a 328 \pm 8	n.d.
K β 3	36.9 \pm 1.3	32.2 \pm 1.3	n.d.	161 \pm 7 a 445	n.d.
K β 4	36.0 \pm 1.3	33.4 \pm 1.3	'MREI	1 a 302 \pm 8	n.d.
K β 5	33.7 \pm 1.2	28.8 \pm 1.2	n.d.	177 \pm 15 a 436	n.d.
K β 6	18.7 \pm 0.6	12.9 \pm 0.6	n.d.	318 \pm 15 a 436	n.d.
K β 7	16.9 \pm 0.6	11.0 \pm 0.6	n.d.	334 \pm 15 a 436	n.d.

1.12. PROTEOLISIS LIMITADA CON ENDOPROTEINASA ASP-N.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol, producido por endoproteinasa Asp-N 0.06% (p/p) se muestra en la figura 37. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 38, y sus características se indican en la tabla 21.

Esta proteasa no digiere la α -tubulina en las condiciones empleadas. En la cadena de β -tubulina se genera un único fragmento de PM aparente ligeramente menor al de la cadena intacta. Este fragmento es reconocido por todos los anticuerpos disponibles frente a β -tubulina, por lo tanto tiene el extremo amino intacto y el corte debe producirse en posiciones más avanzadas del epítipo $\beta(412-431)$. Por la especificidad de la enzima, en el lado amino de restos de Asp, los posibles puntos de corte son: Q426-D427 y A430-D431. Estos dos puntos de corte se encuentran en el extremo final de la región reconocida por anti $\beta(412-431)$. Por comprometer en menor medida la integridad de este epítipo se ha propuesto que el corte se produce entre A430-D431 (figura 36). Se ha descrito que la endoproteinasa Asp-N digiere la β -tubulina de axonema de *Paramecium* en el residuo Asp426 (Redeker, Levilliers et al. 1994). Esta localización del ataque proteolítico no contradice el resultado observado en el presente trabajo ya que a diferencia del isotipo mayoritario de β -tubulina de cerebro porcino, la β -tubulina de *Paramecium* no posee otros residuos de Asp en esta región, potenciales puntos de corte. Por otro lado las condiciones de proteólisis empleadas por Redeker y col. son más enérgicas, 6 horas a 36° C, y justifican la posibilidad de digerir un punto de corte con menor sensibilidad si éste es el único posible.

Este punto de corte es igualmente sensible en la tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol.

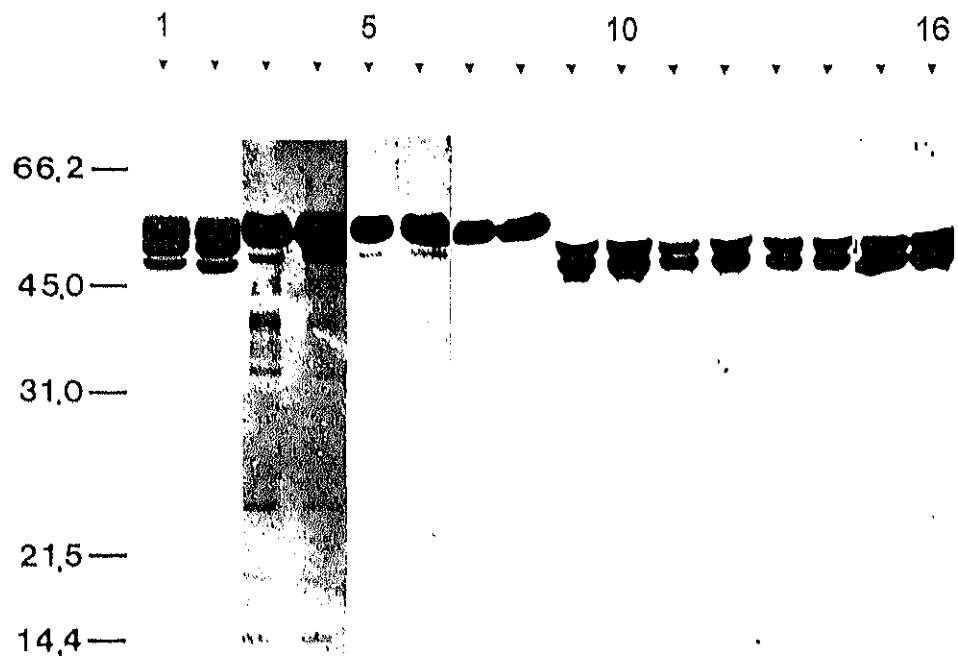


Figura 37. Proteólisis limitada con endoproteinasa Asp-N 0.06% de tubulina en forma dimérica (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15) y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16) en tampón 10 mM NaPi, 6 mM $MgCl_2$, 1 mM GTP, pH 6.7. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 16) inmunodetección con los anticuerpos: anti α (155-168) (calles 3 y 4), anti α (214-226) (calles 5 y 6), anti α (415-443) (calles 7 y 8), anti β (1-13) (calles 9 y 10), anti β (153-165) (calles 11 y 12), anti β (241-256) (calles 13 y 14) y anti β (412-431) (calles 15 y 16). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular, en kD.

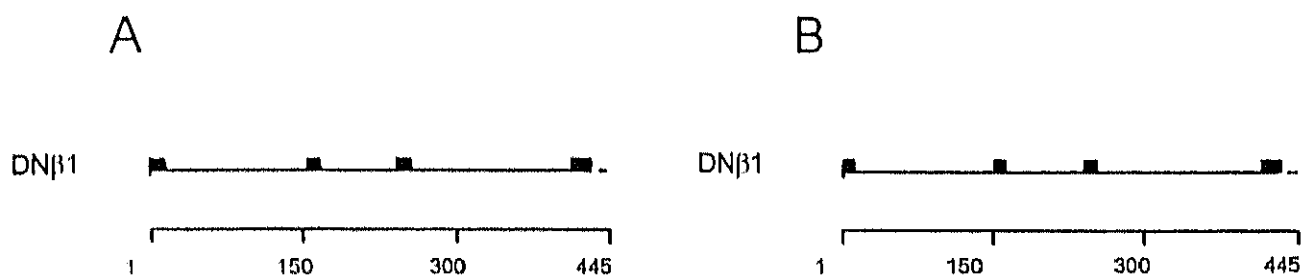


Figura 38. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con endoproteínasa Asp-N de tubulina dimérica (A) y tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítomos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos.

400 410 420 430 440
 aa GEGMDEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATADEQGEFEEEGEEDDA

Figura 36. Secuencia de la región 400-445 de β -tubulina de cerebro porcino. Se ha subrayado la región correspondiente al epítopo β (412-431). En negrilla se indican los residuos de Asp, potenciales puntos de proteólisis limitada de endoproteinasa Asp- N

Tabla 21. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina con Endoproteinasa Asp-N 0.06% (p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
DN β 1	51.0 \pm 1.8	47.2 \pm 1.8	n.d.	1 a c.a. 430	48246*

* Suponiendo que DN β 1 corresponde a la región β (1-430).

1.13. PROTEOLISIS LIMITADA CON BROMELAINA.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol, producido por bromelaina 5% (p/p) se muestra en la figura 39. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 40, y sus características se indican en la tabla 22.

Cadena α :

La bromelaina digiere la α -tubulina en tres regiones preferenciales.

Cerca del epítipo $\alpha(155-168)$ se detectan dos puntos de corte que producen las parejas de fragmentos: BR α 9 con BR α 4 y BR α 8 con BR α 5. A partir de los pesos moleculares aparentes corregidos de los fragmentos estos puntos de corte se localizan en las regiones 140-170 y 152-188, respectivamente. Por la reactividad de estos fragmentos con el anticuerpo anti $\alpha(155-168)$, estos dos puntos de corte se localizan secuencialmente avanzados respecto a éste epítipo.

En la región 290-330 se observan tres puntos de corte que originan los fragmentos BR α 2, BR α 3 y BR α 6, no detectándose los fragmentos complementarios. Se descarta que BR α 3 y BR α 6 se produzcan a partir de BR α 2 por digestión en la región amino terminal, ya que no se detectan los fragmentos de alto PM aparente producto de un único corte en esta región.

La tercera zona de la α -tubulina sensible a la digestión controlada con bromelaina se localiza en el extremo carboxilo. El anticuerpo 1A2, que reconoce el extremo de la α -tubulina tirosinado, no reacciona con ninguna banda de estas muestras (datos no mostrados). El anticuerpo frente a $\alpha(415-443)$ reacciona débilmente con los fragmentos BR α 4 y BR α 5. Este corte, que parece ser único, no compromete totalmente la integridad de éste epítipo, pero reduce notablemente la afinidad del anticuerpo.

No hay cambios apreciables en el patrón de proteólisis limitada de la α -tubulina en la forma polimerizada en microtúbulos inducidos por taxol.

Cadena β :

La bromelaina digiere la β -tubulina principalmente en tres regiones.

A partir de la secuencia amino terminal del fragmento BR β 2, se ha localizado el primer punto de corte entre las posiciones G93-Q94. El otro fragmento producido en este corte es BR β 8, es reconocido por el anticuerpo β (1-13) y corresponde con el fragmento β (1-93).

Un segundo punto de corte se localiza entre las posiciones G277-S278. En él se origina el fragmento BR β 3 que conserva el extremo amino de β -tubulina y corresponde a β (1-277). BR β 4 se produce por una doble digestión en G93-Q94 y G277-S278, y se corresponde con β (94-277). Los fragmentos complementarios de BR β 3 y BR β 4 son: BR β 5, BR β 6 y BR β 7. Los tres se originan por el mismo corte ya que no hay multiplicidad del fragmento BR β 4, y difieren en su extremo carboxilo (ver abajo).

En el extremo carboxilo existen al menos dos puntos de corte. A ellos se debe la presencia de BR β 6 y BR β 7, que se producen a partir de BR β 5. Estos puntos de corte también originan el fragmento BR β 1 de PM aparente ligeramente inferior a la β -tubulina intacta. La presencia de un único fragmento, BR β 1, frente al doblete BR β 6 y BR β 7, se explica por la falta de resolución de la SDS-PAGE.

En la proteólisis limitada con bromelaína de la β -tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol destaca la ausencia de BR β 5 y BR β 6, así como el aumento en la intensidad de la banda correspondiente a BR β 7. Según el origen propuesto para estas bandas, la digestión en el extremo carboxilo en la forma ensamblada es más intensa en el corte más interno, de los dos propuestos, que en el dímero. Esto provoca la acumulación del fragmento de menor tamaño, BR β 7, producido en este corte.

Este efecto se aprecia con menor claridad en las bandas BR β 1 y BR β 2. Se observa una mayor definición de las bandas en la forma ensamblada. Esto es compatible con la presencia de tres especies, no distinguibles en SDS-PAGE, en cada banda BR β 1 y BR β 2, correspondientes al extremo carboxilo intacto y digerido en dos puntos. En la forma ensamblada la digestión controlada con bromelaína acumula una única especie de forma análoga a como ocurre con BR β 5, BR β 6 y BR β 7, que explica el aspecto de las bandas en la SDS-PAGE.

La digestión en los puntos internos de corte se produce con similar intensidad en la β -tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol.

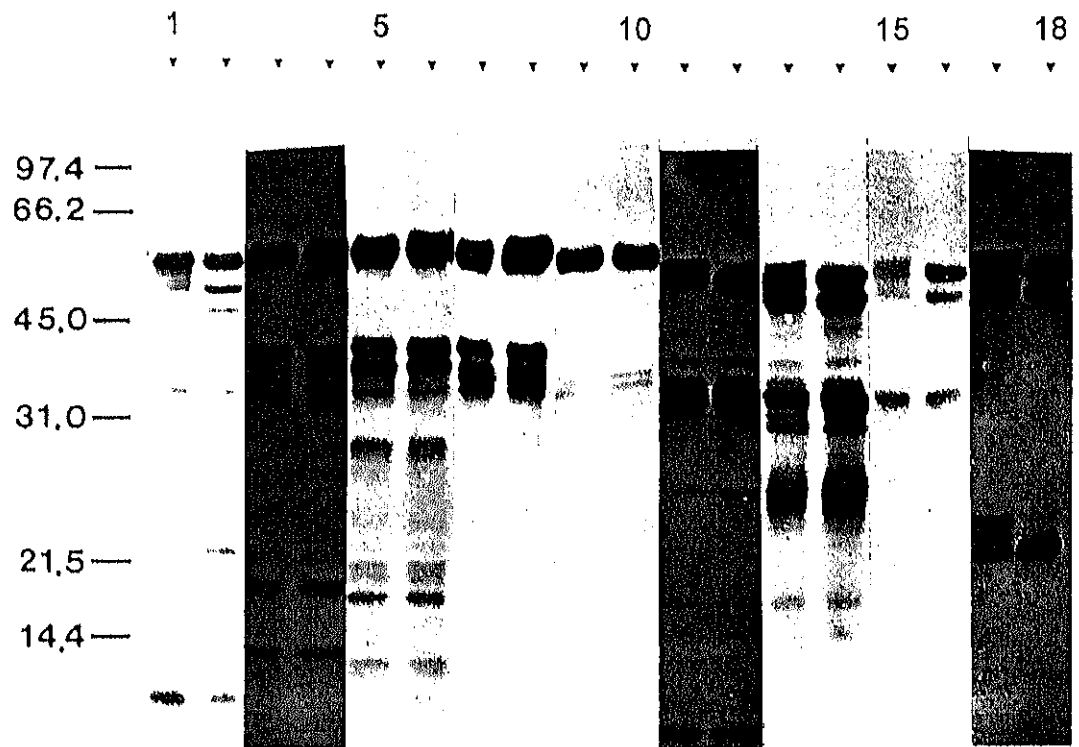


Figura 39. Proteólisis limitada con bromelaína 5% de tubulina en forma dimérica (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17) y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18) en tampón 10 mM NaPI, 6 mM $MgCl_2$, 1 mM GTP, pH 6.7. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 18) inmunodetección con los anticuerpos: anti α -tubulina acetilada en Lys40 (calles 3 y 4), anti α (155-168) (calles 5 y 6), anti α (214-226) (calles 7 y 8), anti α (415-443) (calles 9 y 10), anti β (1-13) (calles 11 y 12), anti β (153-165) (calles 13 y 14), anti β (241-256) (calles 15 y 16) y anti β (412-431) (calles 17 y 18). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular, en kD.

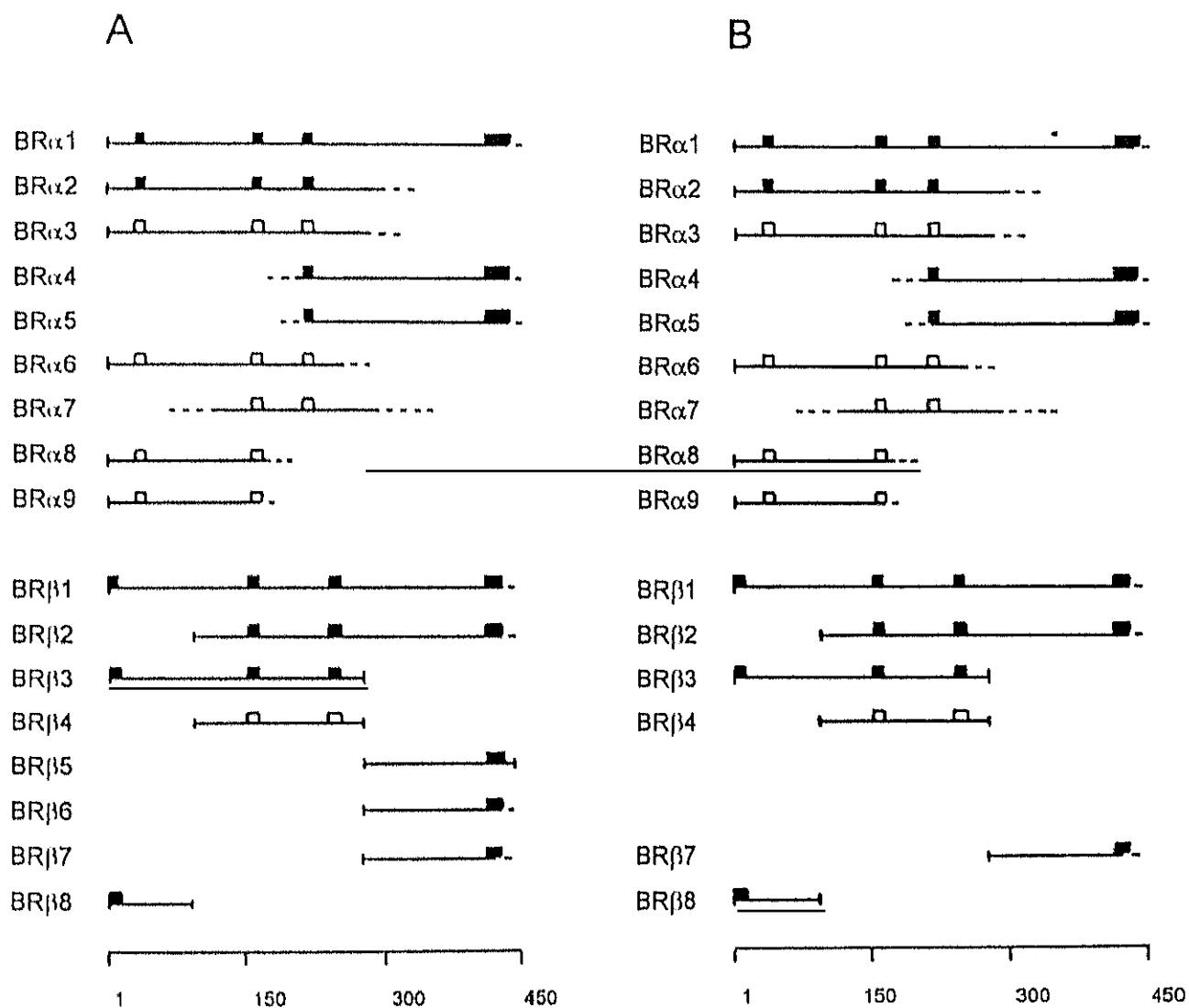


Figura 40. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con bromelaina de tubulina dimérica (A) y tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítomos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

Tabla 22. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina con Bromelaína 5% (p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
BR α 1	58.3 \pm 2.0	48.7 \pm 2.0	n.d.	1 a 439 \pm 10	n.d.
BR α 2	41.9 \pm 1.5	36.2 \pm 1.5	n.d.	1 a 327 \pm 10	n.d.
BR α 3	39.6 \pm 1.4	34.4 \pm 1.4	n.d.	1 a 311 \pm 10	n.d.
BR α 4	39.6 \pm 1.4	31.6 \pm 1.4	n.d.	155 \pm 19 a 439 \pm 10	n.d.
BR α 5	37.7 \pm 1.3	30.1 \pm 1.3	n.d.	170 \pm 18 a 439 \pm 10	n.d.
BR α 6	36.0 \pm 1.3	31.6 \pm 1.3	n.d.	1 a 286 \pm 8	n.d.
BR α 7	29.4 \pm 1.0	26.6 \pm 1.0	n.d.		n.d.
BR α 8	19.3 \pm 0.7	18.9 \pm 0.7	n.d.	1 a 172 \pm 5	n.d.
BR α 9	16.0 \pm 0.6	16.4 \pm 0.6	n.d.	1 a 151 \pm 5	n.d.
BR β 1	54.0 \pm 1.9	50.0 \pm 1.9	n.d.	1 a c.a. 440	n.d.
BR β 2	51.0 \pm 1.8	47.1 \pm 1.8	⁹⁴ QxGAGNNxA	94 a c.a. 445	39529
BR β 3	39.0 \pm 1.4	36.1 \pm 1.4	n.d.	1 a 277	30454
BR β 4	25.4 \pm 0.9	23.7 \pm 0.9	n.d.	94 a 277	20128
BR β 5	22.0 \pm 0.8	16.4 \pm 0.8	n.d.	278 a 445	19419
BR β 6	21.0 \pm 0.7	15.3 \pm 0.7	n.d.	278 a 410 \pm 5	n.d.
BR β 7	20.0 \pm 0.7	14.3 \pm 0.7	²⁷⁸ SQQYRA	278 a 401 \pm 5	n.d.
BR β 8	11.0 \pm 0.4	10.4 \pm 0.4	n.d.	1 a 93	10344

2. PROTEOLISIS LIMITADA COMPARADA DE TUBULINA DIMERICA Y HOJAS DE TUBULINA INDUCIDAS POR Zn^{2+} .

2.1. CARACTERIZACION DE LAS HOJAS DE TUBULINA INDUCIDAS POR Zn^{2+} .

Para obtener polímeros laminares de tubulina inducidos por Zn^{2+} ha sido necesario incorporar 0.1 mM $MgCl_2$ en el tampón ya que sin él la tubulina una vez equilibrada retiene una concentración total residual de magnesio c.a. 0.03 mM a la cual la proteína no es estable, mientras que con la inclusión de 0.1 mM $MgCl_2$ se obtiene una concentración total residual de c.a. 0.144 mM que garantiza la estabilidad y funcionalidad de la tubulina durante el ensayo (datos no presentados y G. Rivas comunicación personal).

El ensamblaje de las hojas de tubulina- Zn^{2+} en ausencia de glicerol (figura 41A), a la concentración de proteína empleada, alcanza un máximo de turbidez antes de 30 min. Estos polímeros son estables a 25° C pero despolimerizan a 4° C (figura 42). La concentración crítica del ensamblaje de estos polímeros es de 0.68 ± 0.15 mg/ml, esto supone que a las concentraciones de tubulina empleadas, c.a. 2.0 mg/ml, aproximadamente el 34% de la proteína está en la forma no ensamblada. Esto introduce una ambigüedad en la interpretación de los efectos del estado de agregación sobre la proteólisis limitada.

Con el fin de reducir la fracción de tubulina no polimerizada se estudió el efecto del glicerol en la formación de las hojas de tubulina- Zn^{2+} (figura 41B). Se empleó el tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM $MgCl_2$, 1 mM GTP, 0.3 mM $ZnCl_2$, pH 6.5 (NaOH). A las concentraciones de tubulina empleadas, la polimerización a 37° C alcanza un máximo, según medidas de turbidez, en los primeros 30 minutos. Estos polímeros son estables a 25° C y la depolimerización en frío está muy reducida (figura 43). La concentración crítica en estas condiciones fue 0.17 ± 0.03 mg/ml. Esto implica que la fracción de tubulina no polimerizada es menor del 10% y a efectos prácticos se puede considerar que los resultados de proteólisis limitada se deben a la polimerización.

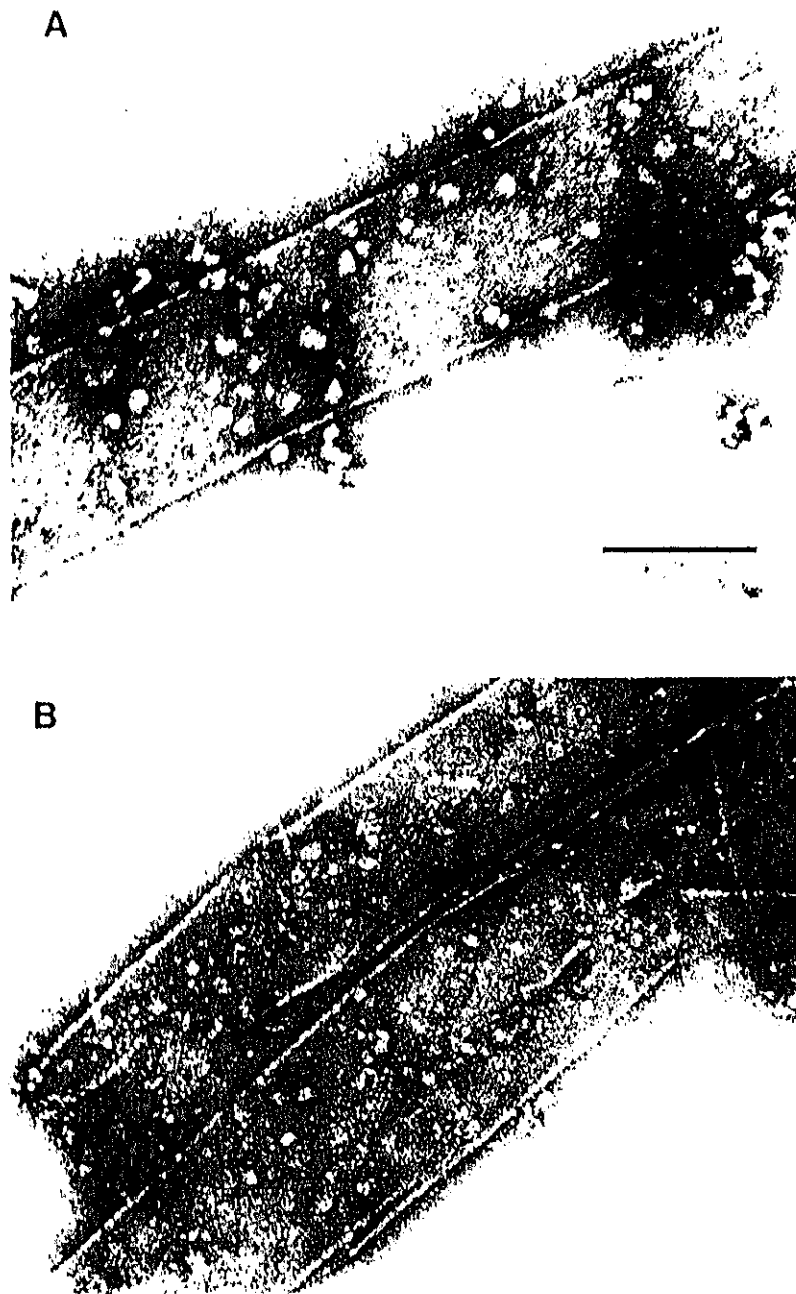


Figura 41. Micrografías electrónicas de hojas de tubulina inducidas por Zn^{2+} en los tampones: (panel A) 100 mM MES, 0.1 mM MgCl_2 , 0.3 mM ZnCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.5 y (panel B) 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.3 mM ZnCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.5. La barra corresponde a 200 nm.

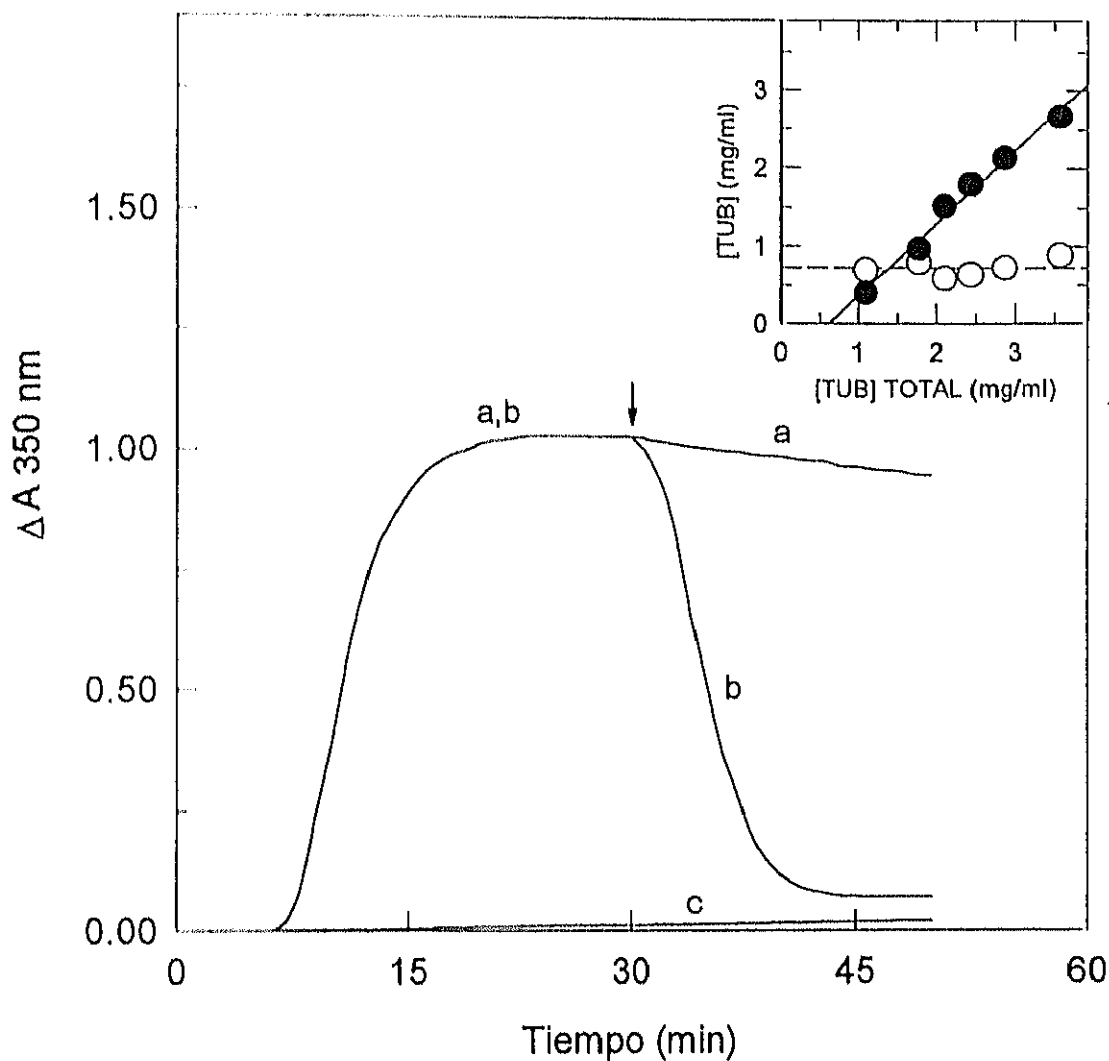


Figura 42. Curso de tiempo turbidimétrico del ensamblaje *in vitro* de tubulina 2.0 mg/ml en tampón 100 mM MES, 0.1 mM MgCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.5. La reacción se inició calentando la muestra de 4° C a 37° C. (a) ensamblaje con 0.3 mM ZnCl_2 , la flecha indica el enfriamiento de la muestra a 25° C o a 4° C (curva b). (c) muestra sin ZnCl_2 . Inserto: cuantificación de la polimerización de tubulina *in vitro* inducido por Zn^{2+} a 37° C. (●) concentración de tubulina polimerizada. (○) concentración de tubulina dimérica. (línea de trazo continuo) recta de regresión lineal de la concentración de tubulina polimerizada frente a concentración total de tubulina. (línea de trazo discontinuo) valor medio de la concentración de tubulina no polimerizada.

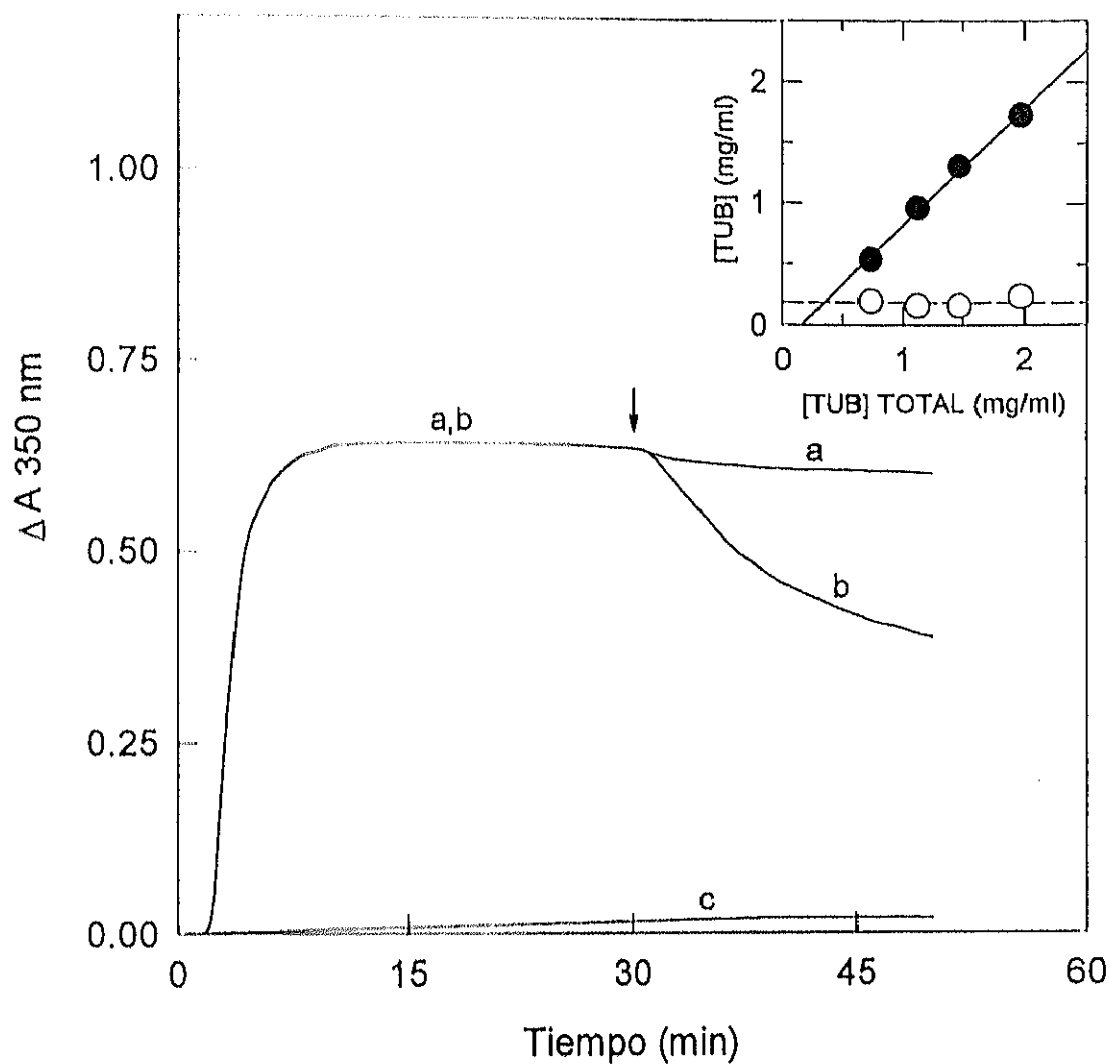


Figura 43. Curso de tiempo turbidimétrico del ensamblaje *in vitro* de tubulina 2.0 mg/ml en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM $MgCl_2$, 1 mM GTP, pH 6.5. La reacción se inició calentando la muestra de 4° C a 37° C. (a) ensamblaje con 0.3 mM $ZnCl_2$, la flecha indica el enfriamiento de la muestra a 25° C o a 4° C (curva b). (c) muestra sin $ZnCl_2$. Inserto: cuantificación de la polimerización de tubulina *in vitro* inducido por Zn^{2+} y glicerol a 37° C. (●) concentración de tubulina polimerizada. (○) concentración de tubulina dimérica. (línea de trazo continuo) recta de regresión lineal de la concentración de tubulina polimerizada frente a concentración total de tubulina. (línea de trazo discontinuo) valor medio de la concentración de tubulina no polimerizada.

2.2. CAMBIO CONFORMACIONAL ASOCIADO A LA UNIÓN DE Zn^{2+} .

Los resultados de proteólisis limitada de tubulina polimerizada en hojas de Zn^{2+} -glicerol deben compararse con los de tubulina dimérica en presencia de Zn^{2+} , para evaluar el efecto del estado de agregación sobre la sensibilidad a las proteasas y no la influencia del catión sobre su actividad.

Como condición en la que la tubulina- Zn^{2+} no polimeriza se empleó el tampón: 10 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 1 mM GTP, 0.3 mM ZnCl_2 , pH 6.5.

El espectro de dicroísmo circular, en la región del ultravioleta lejano, de la tubulina fueron similares en este tampón (para las medidas se empleó 0.1 mM GTP) independientemente de la presencia del Zn^{2+} . Se obtuvo un espectro igual, dentro del error experimental, cuando la tubulina se equilibró en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP, pH 6.5 en ausencia de Zn^{2+} . Se observó un cambio significativo en la región 200-210 nm del espectro de la tubulina en este tampón en presencia de 0.3 mM ZnCl_2 (figura 44). Con el fin de prevenir la polimerización en éste último caso, todas las medidas se realizaron a 5° C.

El cambio en el espectro de dicroísmo no se debe exclusivamente a la naturaleza y concentración del tampón: MES 100 mM. El espectro de dicroísmo circular en este tampón, en ausencia de glicerol, es igual dentro del error experimental al observado en tampón fosfato neutro (figura 45). Este resultado es coincidente con el observado por Lee y Timasheff, que no observaron diferencia entre el espectro de la tubulina en tampón 10 mM MES y 10 mM fosfato, considerado este último como estado de referencia (Lee y Timasheff 1977). El glicerol adicionado al tampón 100 mM MES tampoco induce el cambio conformacional en la tubulina en ausencia de Zn^{2+} . Esto concuerda con lo descrito en tampón fosfato neutro (Lee y Timasheff 1977).

Se observó una dependencia del cambio conformacional de tubulina detectado por dicroísmo circular con la concentración de MES del tampón, en presencia de una concentración de Zn^{2+} constante (figura 46). El efecto sobre la señal de dicroísmo no se detecta a concentraciones de MES iguales o inferiores a 50 mM. Hasta la concentración de 150 mM MES estudiada no se observó una estabilización del efecto.

Se estudió la dependencia con la concentración de Zn^{2+} del cambio en la señal de

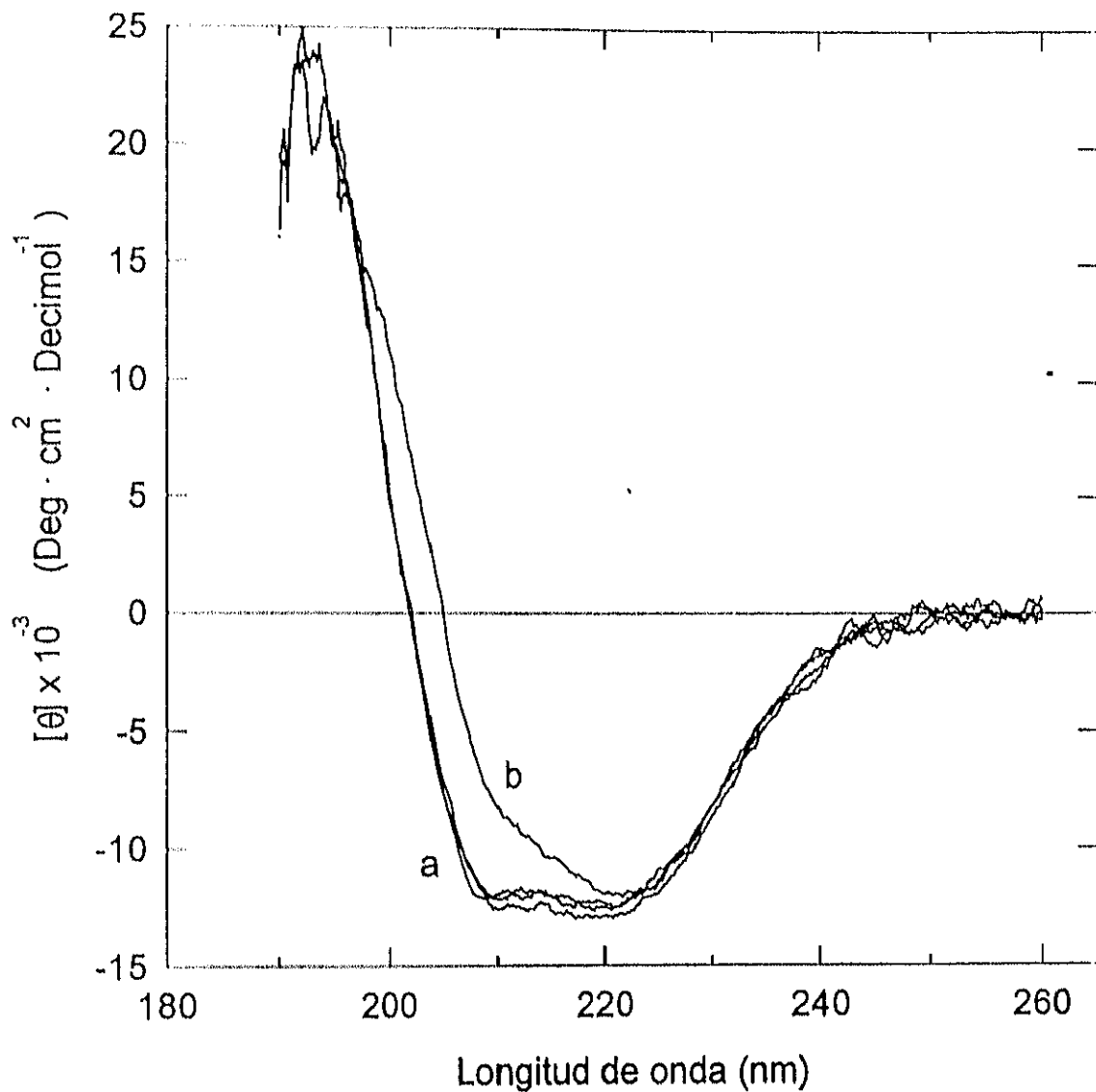


Figura 44. Espectros de dicroísmo circular de tubulina en tampón 10 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP en ausencia (a) y en presencia de 0.3 mM ZnCl_2 (a), y en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP en ausencia 0.3 mM ZnCl_2 (a), y en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP en presencia de 0.3 mM ZnCl_2 (b). Las medidas se realizaron a 5° C.

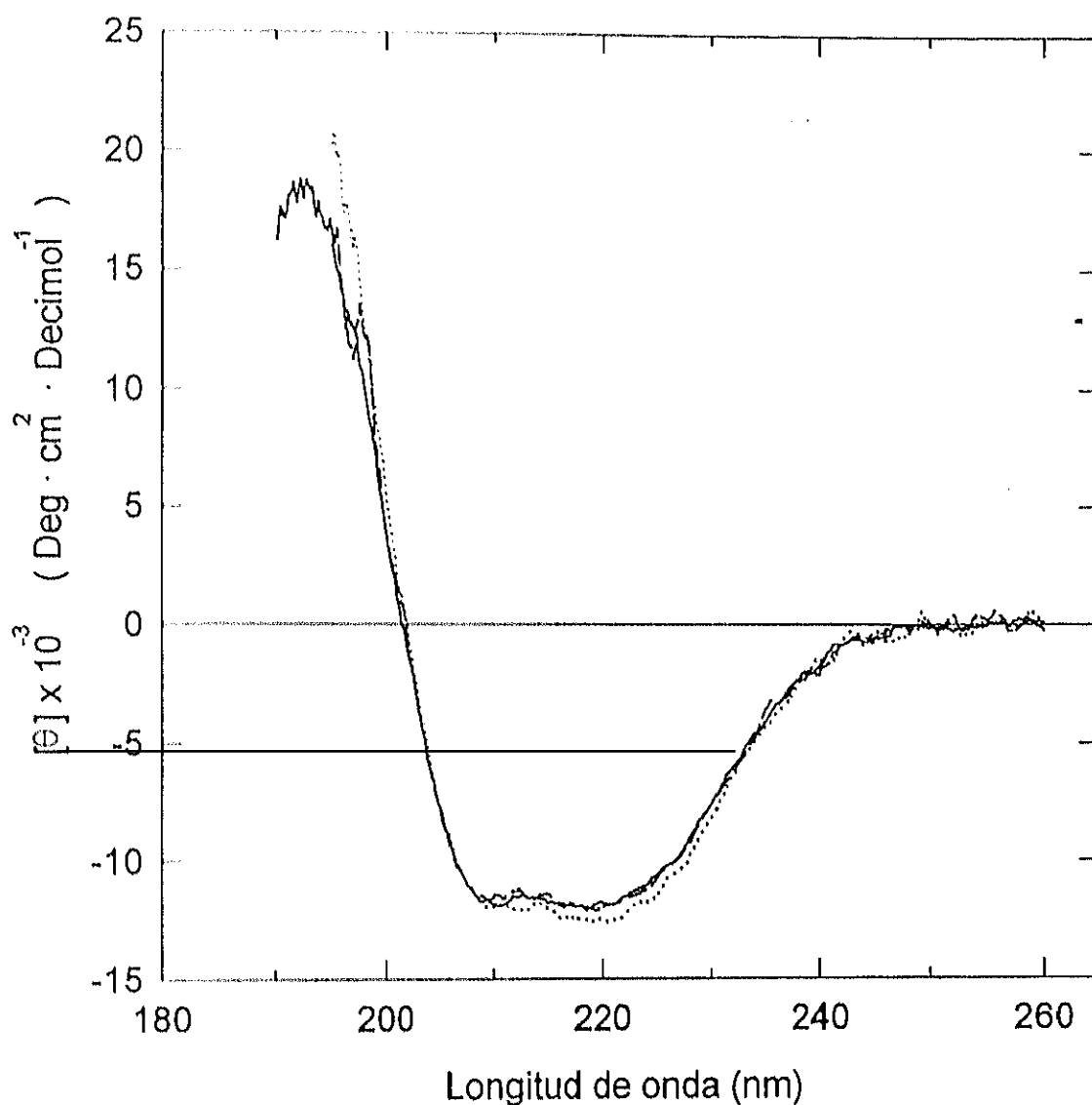


Figura 45. Espectros de diroismo circular de tubulina en tampón: 10 mM NaPi, 0.1 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP, pH 7.0; y en tampón: 100 mM MES, 0.1 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP, pH 6.5 (trazo continuo). Y en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP, pH 6.5 (trazo de puntos). Las medidas se realizaron a 25° C. Los espectros son coincidentes dentro del error experimental.

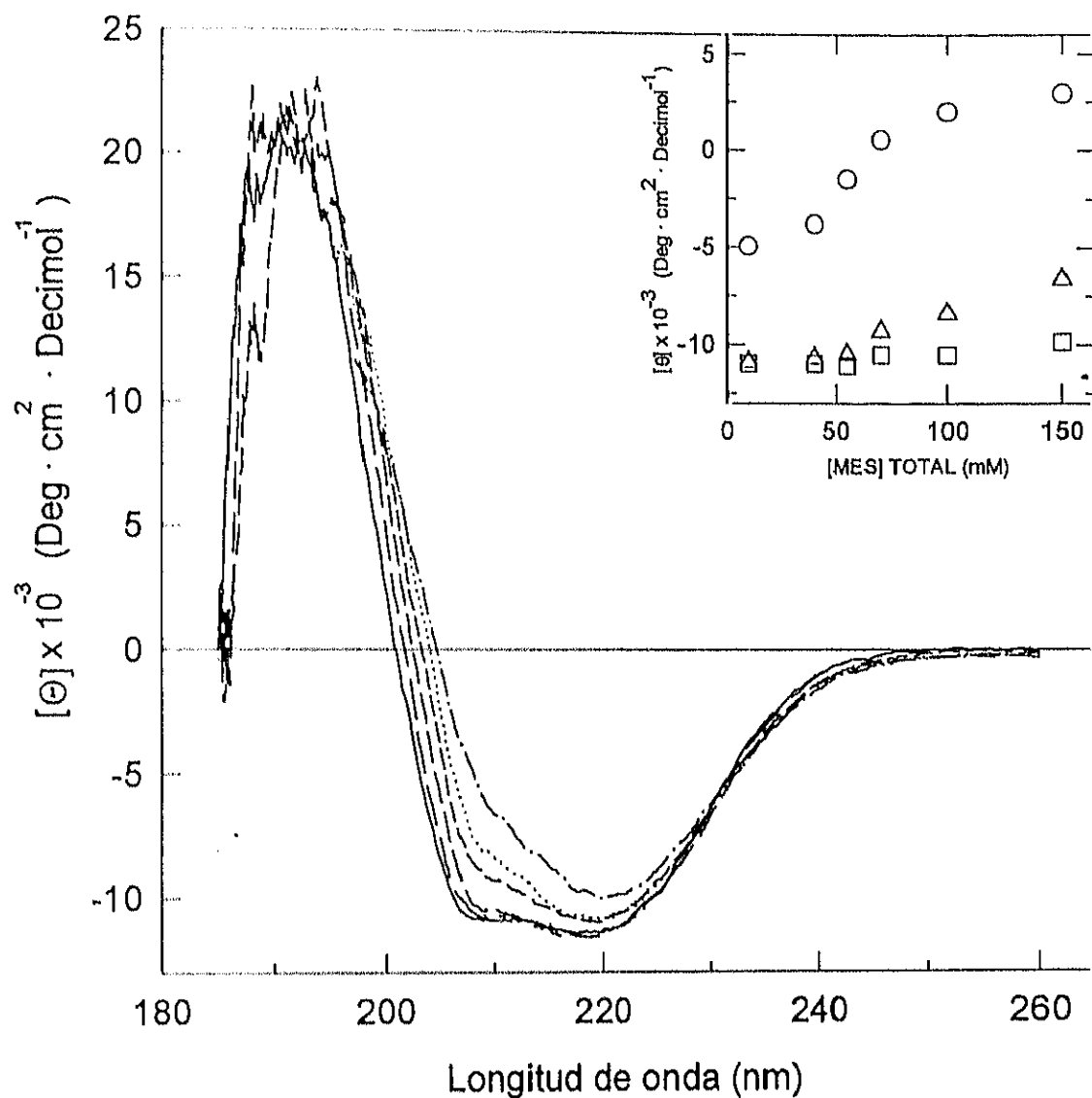


Figura 46. Espectros de dicroísmo circular de tubulina en tampón 10 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP (trazo continuo), y en tampones similares en los que la concentración de MES fue: 40 mM (trazo discontinuo largo), 55 mM (trazo discontinuo mediano), 70 mM (trazo discontinuo corto), 100 mM (trazo punteado) y 150 mM (trazo alterno). Las medidas se realizaron a 5° C. Inserto: valores de elipticidad molar por residuo medio de tubulina a 203 nm (O), 210 nm (Δ) y 222 nm (\square) en función de la concentración total de MES.

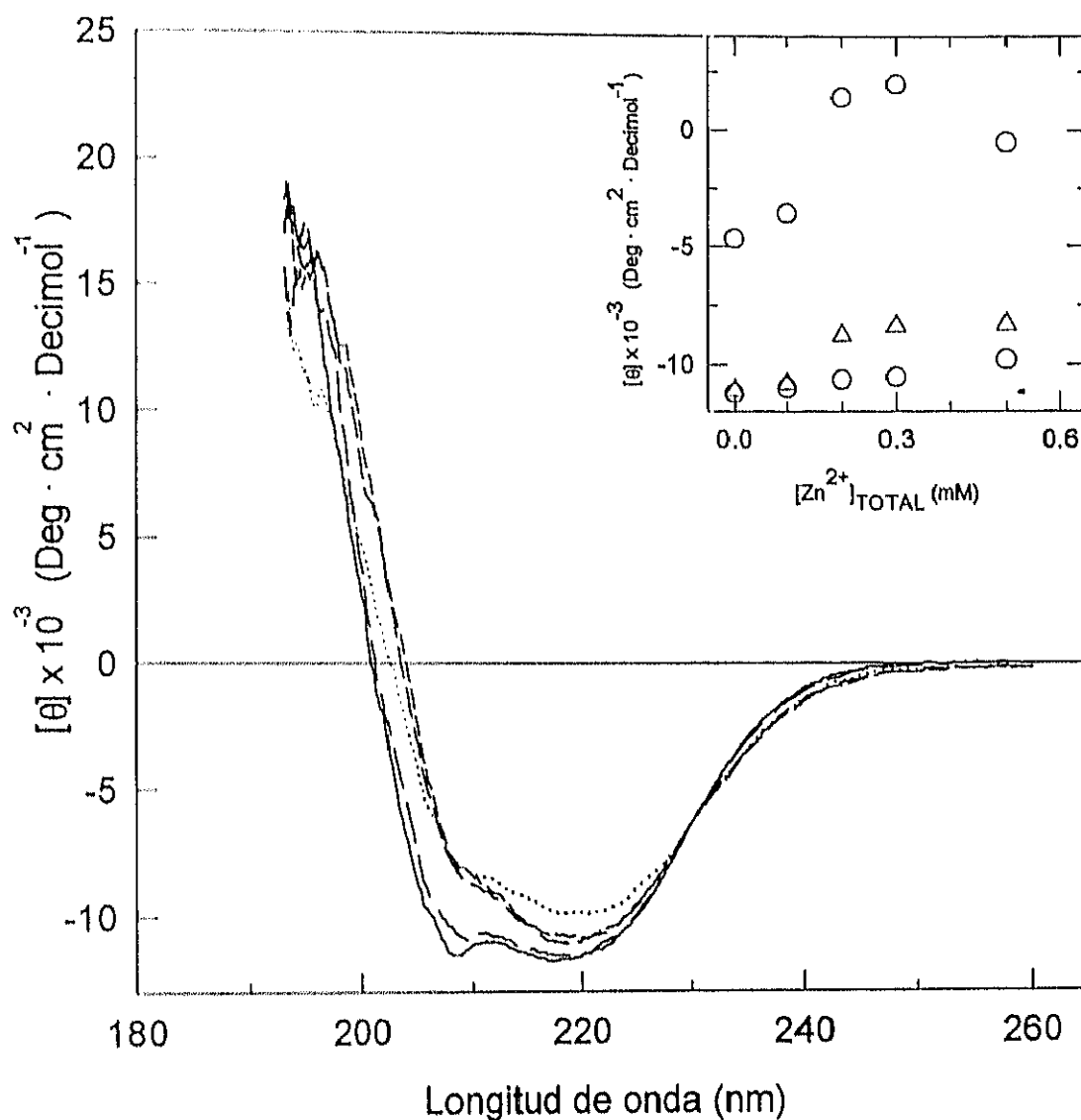


Figura 47. Espectros de diroismo circular de tubulina en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP (trazo continuo), y en el mismo tampón con concentraciones totales de Zn^{2+} crecientes: 0.1 mM (trazo discontinuo largo), 0.2 mM (trazo discontinuo mediano), 0.3 mM (trazo discontinuo corto) y 0.5 mM (trazo punteado). Las medidas se realizaron a 5° C. Inserto: valores de elipticidad molar por residuo medio de tubulina a 203 nm (O), 210 nm (Δ) y 222 nm (\square) en función de la concentración total de Zn^{2+} .

dicroísmo. Se aprecia una transición brusca entre 0.1 mM y 0.2 mM de concentración total de Zn^{2+} (figura 47). A 1.0 mM Zn^{2+} la tubulina precipita en estas condiciones.

Con el fin de descartar un posible proceso de agregación inducido por Zn^{2+} en estas condiciones, incluso a baja temperatura, se determinó el coeficiente de sedimentación de la tubulina ca. 2 mg/ml en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP, pH 6.5 en presencia de cantidades crecientes de ZnCl_2 . Los resultados se muestran en la tabla 23. Como se aprecia, no hay un aumento significativo del coeficiente de sedimentación en presencia de Zn^{2+} especialmente entre 0.1 y 0.2 mM, concentraciones en las que se aprecia la transición en la señal de dicroísmo. Se puede descartar que este cambio sea debido a un proceso de agregación.

Se eligió la tubulina en tampón 10 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 1 mM GTP, 0.3 mM ZnCl_2 , pH 6.5, como estado de referencia en los experimentos de proteólisis limitada. Como consecuencia del cambio conformacional observado en la forma competente para el ensamblaje, las diferencias en la proteólisis limitada de la proteína polimerizada en hojas de tubulina- Zn^{2+} -glicerol pueden deberse a la orientación del dímero dentro del polímero o al cambio conformacional que le acompaña.

Tabla 23. Coeficientes de sedimentación de tubulina, 2.0 mg/ml, en 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP, 0.3 mM ZnCl_2 , pH 6.5, a 8° C.

[Zn ²⁺] Total (mM)	S ^a
0.0	1.12
0.1	1.20
0.2	1.20

^a Coeficientes de sedimentación no corregidos

2.3. PROTEOLÍISIS LIMITADA CON TRIPSINA.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} , producido por tripsina 1% (p/p) se muestra en la figura 48. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 49, y sus características se indican en la tabla 24.

Cadena α :

En la forma dimérica la tripsina digiere la α -tubulina en el punto de corte K339-S340, ya descrito.

En la α -tubulina polimerizada en hojas de tubulina-Zn-glicerol este punto de corte está protegido. No se observa la aparición de nuevos fragmentos en la proteólisis limitada de la forma ensamblada.

Cadena β :

El principal punto de corte se localiza entre las posiciones K174-V175. Este punto de corte sigue siendo sensible en la tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} y glicerol.

El corte observado en la proteólisis limitada de la forma dimérica que se localiza en la región 300-330, es minoritario en presencia de Zn^{2+} .

Se observa un fragmento minoritario de alto peso molecular aparente, Z-TR α 1. Se produce por un corte en la región 360-380. No se observa el fragmento complementario producido en este corte. Este punto de corte se protege en la forma polimerizada.

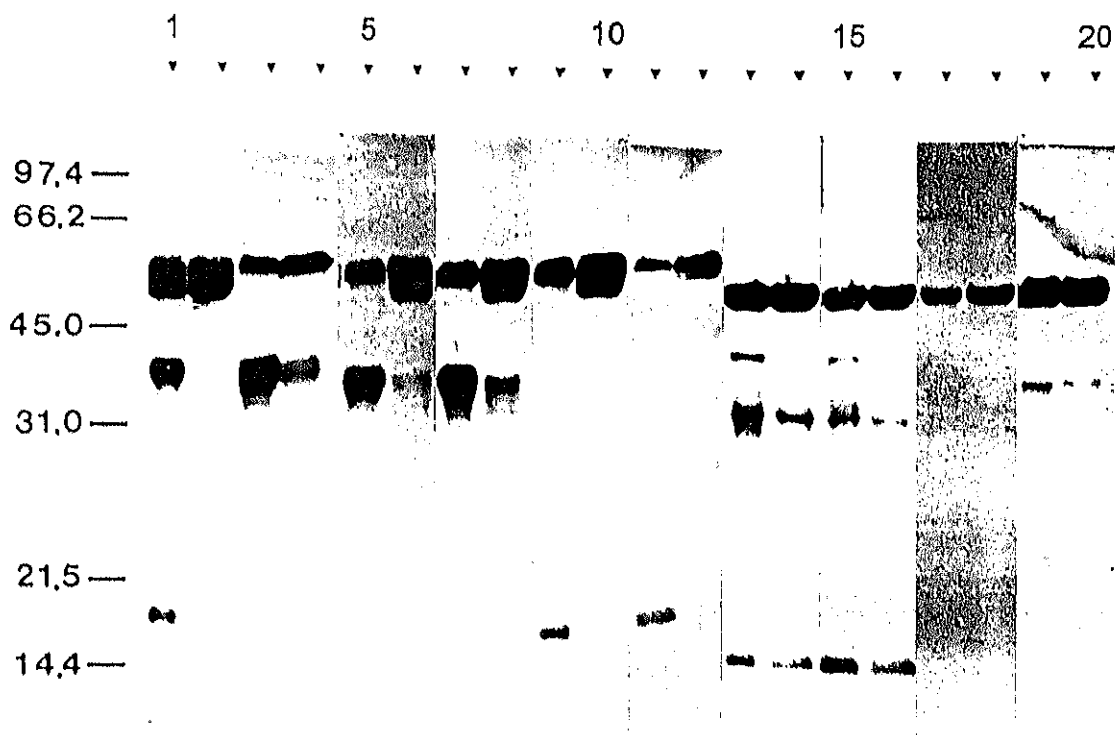


Figura 48. Proteólisis limitada con tripsina TPCK 1% (p/p) de tubulina- Zn^{2+} en forma no ensamblada (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19) en tampón 10 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.3 mM ZnCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.5 y polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} -glicerol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20) en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.3 mM ZnCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.5. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 20) inmunodetección con los anticuerpos: anti α -tubulina acetilada en Lys40 (calles 3 y 4), anti α (155-168) (calles 5 y 6), anti α (214-226) (calles 7 y 8), anti α (415-443) (calles 9 y 10), anti α -tubulina tirosinada (calles 11 y 12), anti β (1-13) (calles 13 y 14), anti β (153-165) (calles 15 y 16), anti β (241-256) (calles 17 y 18) y anti β (412-431) (calles 19 y 20). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular, en kD.

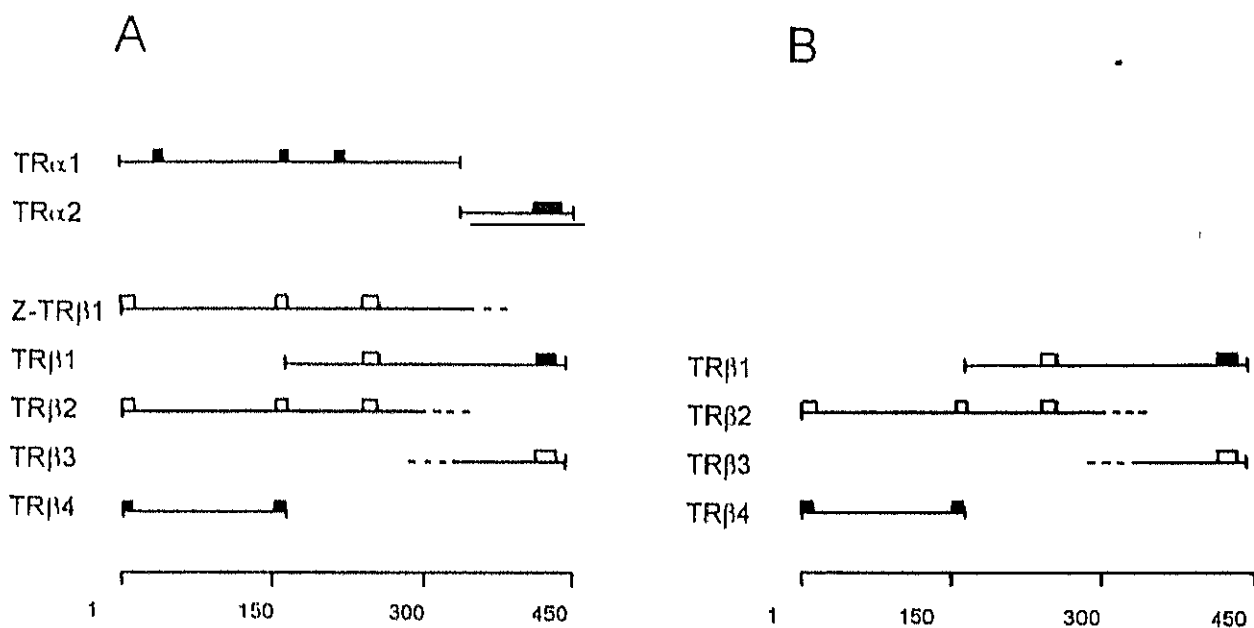


Figura 49. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con tripsina-TPCK de tubulina-Zn²⁺ dimérica (A) y tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn²⁺ y glicerol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítomos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

Tabla 24. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina-Zn-glicerol con Tripsina-TPCK 1%(p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
TR α 1	40.0 \pm 1.4	34.7 \pm 1.4	n.d.	1 a 339	37520
TR α 2	17.0 \pm 0.6	14.0 \pm 0.6	n.d.	340 a 451	12576
Z-TR β 1	44.0 \pm 1.5	40.8 \pm 1.5	n.d.	1 a 368 \pm 10	n.d.
TR β 1	40.0 \pm 1.4	35.5 \pm 1.4	n.d.	175 a 445	30887
TR β 2	35.1 \pm 1.2	35.7 \pm 1.2	n.d.	1 a 325 \pm 8	n.d.
TR β 3	22.0 \pm 0.8	16.4 \pm 0.8	n.d.	309 \pm 9 a 445	n.d.
TR β 4	15.5 \pm 0.5	14.6 \pm 0.5	n.d.	1 a 174	18986

2.4. PROTEOLÍISIS LIMITADA CON QUIMOTRIPSINA.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} , producido por quimotripsina 2% (p/p) se muestra en la figura 50. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 51, y sus características se indican en la tabla 25.

Cadena α :

La quimotripsina digiere la tubulina en un punto de corte, entre las posiciones F169-S170. La sensibilidad de este punto es menor en los hojas de tubulina inducidas por Zn^{2+} -glicerol.

Cadena β :

El principal punto de corte en la β -tubulina se localiza entre las posiciones Y281-R282. Este punto de corte se protege en la forma ensamblada.

Existen dos puntos de corte que generan los fragmentos de bajo PM aparente: el minoritario CH β 3 y CH β 4. Según el peso molecular aparente corregido estos puntos de corte se localizan en la región 130-155. Sin embargo ambos son reconocidos por el anticuerpo frente a β (153-165), localizándose en posiciones ligeramente más avanzadas a este epítipo. Por la especificidad de la quimotripsina la potencial ubicación de estos puntos de corte es: F168-S169 y Y183-N184. Estos puntos de corte no se protegen en la tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} -glicerol.

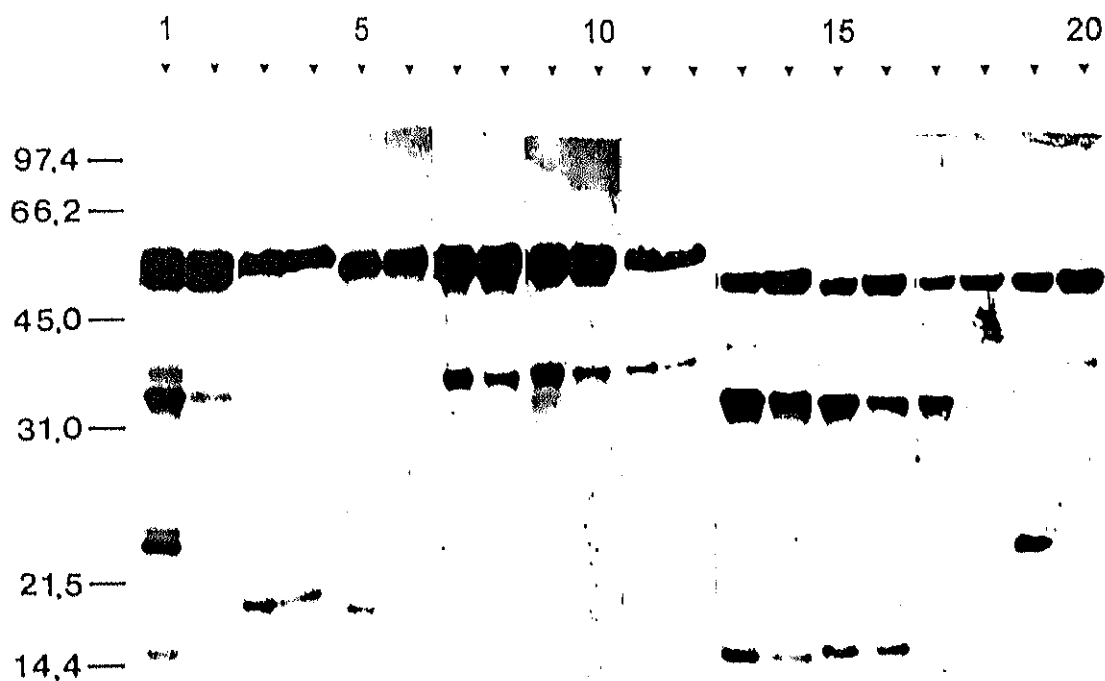


Figura 50. Proteólisis limitada con quimotripsina TLCK 2% (p/p) de tubulina- Zn^{2+} en forma no ensamblada (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19) en tampón 10 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.3 mM ZnCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.5 y polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} -glicerol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20) en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.3 mM ZnCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.5. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 20) inmunodetección con los anticuerpos: anti α -tubulina acetilada en Lys40 (calles 3 y 4), anti α (155-168) (calles 5 y 6), anti α (214-226) (calles 7 y 8), anti α (415-443) (calles 9 y 10), anti α -tubulina tirosinada (calles 11 y 12), anti β (1-13) (calles 13 y 14), anti β (153-165) (calles 15 y 16), anti β (241-256) (calles 17 y 18) y anti β (412-431) (calles 19 y 20). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular, en kD.

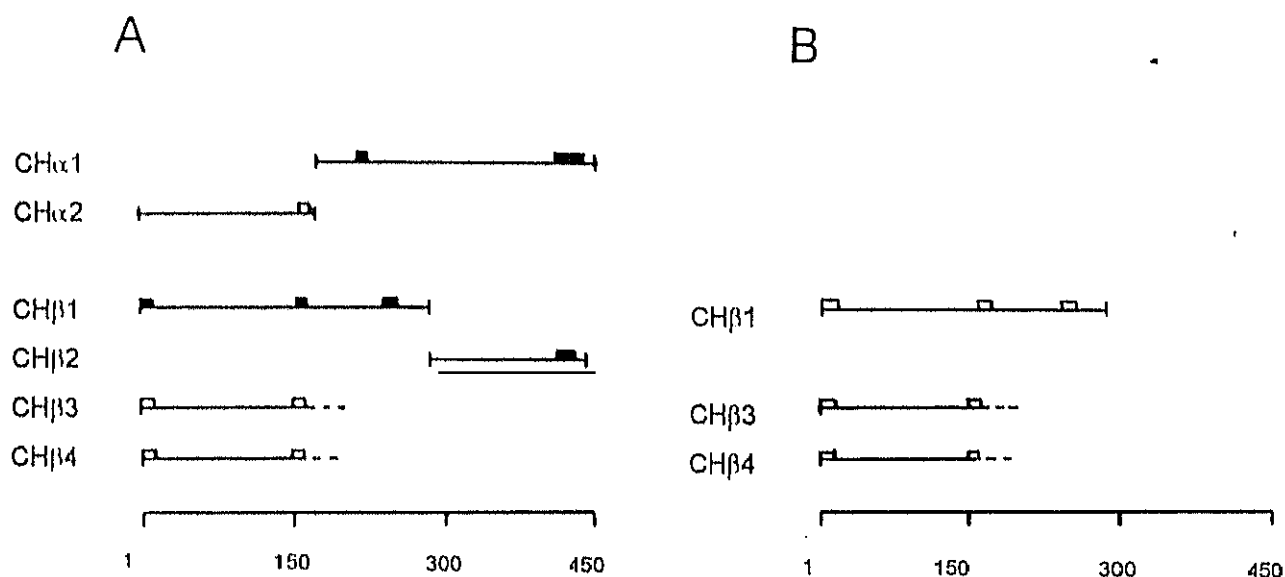


Figura 51. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con quimotripsina de tubulina-Zn²⁺ dimérica (A) y tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn²⁺ y glicerol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítomos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

Tabla 25. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina-Zn²⁺-glicerol con Quimotripsina-TLCK 2% (p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico
CH α 1	40.0 \pm 1.4	31.9 \pm 1.4	¹⁷⁰ SIYPAPQVS	170 a 451	31529
CH α 2	17.0 \pm 0.6	17.1 \pm 0.6	n.d.	1 a 169	18567
CH β 1	37.0 \pm 1.3	34.3 \pm 1.3	n.d.	1 a 281	30960
CH β 2	22.0 \pm 0.8	16.4 \pm 0.8	²⁸² xALTVPxL	282 a 445	18873
CH β 3	17.0 \pm 0.6	15.9 \pm 0.6	n.d.	1 a 146 \pm 9	n.d.
CH β 4	16.0 \pm 0.6	15.0 \pm 0.6	n.d.	1 a 138 \pm 9	n.d.

2.5. PROTEOLISIS LIMITADA CON ELASTASA.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} , producido por elastasa 2% (p/p) se muestra en la figura 52. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 53, y sus características se indican en la tabla 26.

Cadena α :

La elastasa digiere la α -tubulina en tres puntos.

La digestión entre las posiciones S178-T179 origina el fragmento $EL\alpha 4$ y dos fragmentos complementarios: $EL\alpha 1$ y $Z-EL\alpha 1$.

La digestión entre las posiciones A294-C295 origina el fragmento $EL\alpha 2$ y dos fragmentos complementarios: $EL\alpha 3$ y $Z-EL\alpha 2$.

La duplicidad de $EL\alpha 1/Z-EL\alpha 1$ y $EL\alpha 3/Z-EL\alpha 2$ se debe a un tercer punto de corte situado en la región carboxilo terminal de la α -tubulina. $Z-EL\alpha 1$ y $Z-EL\alpha 2$ son reconocidos por el anticuerpo anti $\alpha(415-443)$ pero no por el anticuerpo 1A2, específico de la forma tirosinada en el extremo carboxilo de α -tubulina. Este punto de corte se localiza entre el epitopo $\alpha(415-443)$ y el extremo carboxilo (Tyr 451). La elastasa hidroliza preferentemente enlaces peptídicos en los que el grupo carbonilo es correspondiente a un aminoácido si carga y no aromático. Los posibles puntos de corte son: G442-E443, G444-E445 y G448-E449.

Cadena β :

La proteólisis de la β -tubulina se produce en un único punto de corte localizado entre C354-D355.

Todos los puntos de proteólisis limitada son igualmente sensibles en la tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} -glicerol.

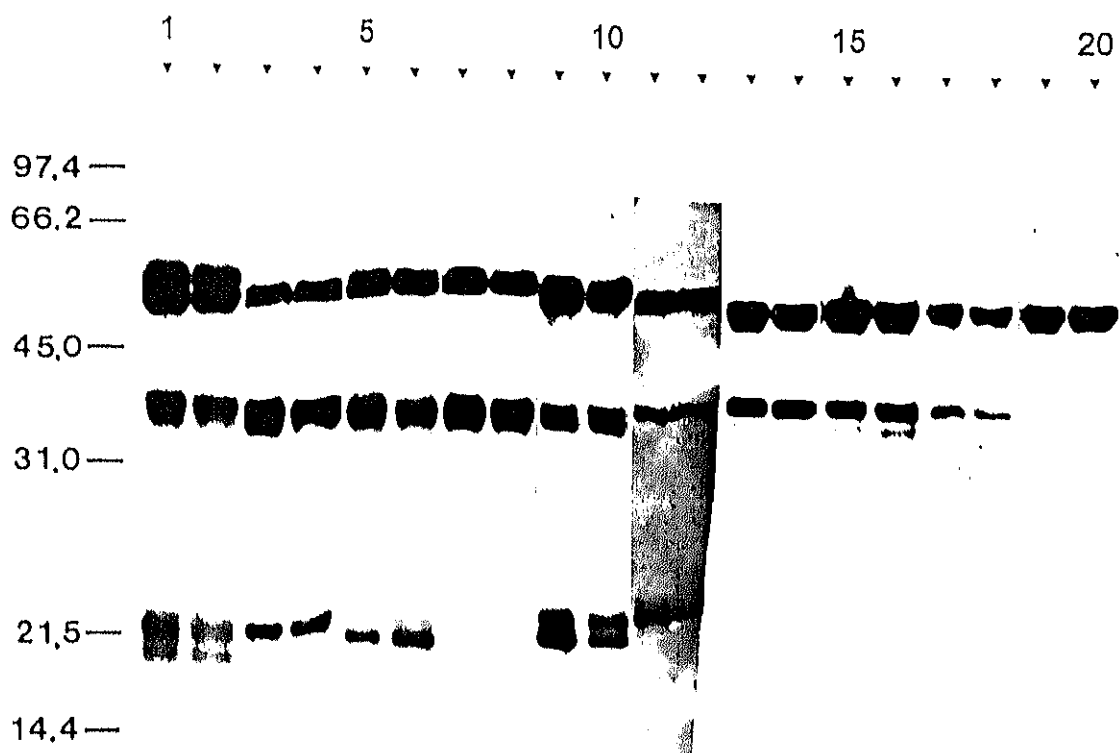


Figura 52. Proteólisis limitada con elastasa 2% (p/p) de tubulina- Zn^{2+} en forma no ensamblada (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19) en tampón 10 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.3 mM ZnCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.5 y polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} -glicerol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20) en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.3 mM ZnCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.5. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 20) inmunodetección con los anticuerpos: anti α -tubulina acetilada en Lys40 (calles 3 y 4), anti α (155-168) (calles 5 y 6), anti α (214-226) (calles 7 y 8), anti α (415-443) (calles 9 y 10), anti α -tubulina tirosinada (calles 11 y 12), anti β (1-13) (calles 13 y 14), anti β (153-165) (calles 15 y 16), anti β (241-256) (calles 17 y 18) y anti β (412-431) (calles 19 y 20). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular, en kD.

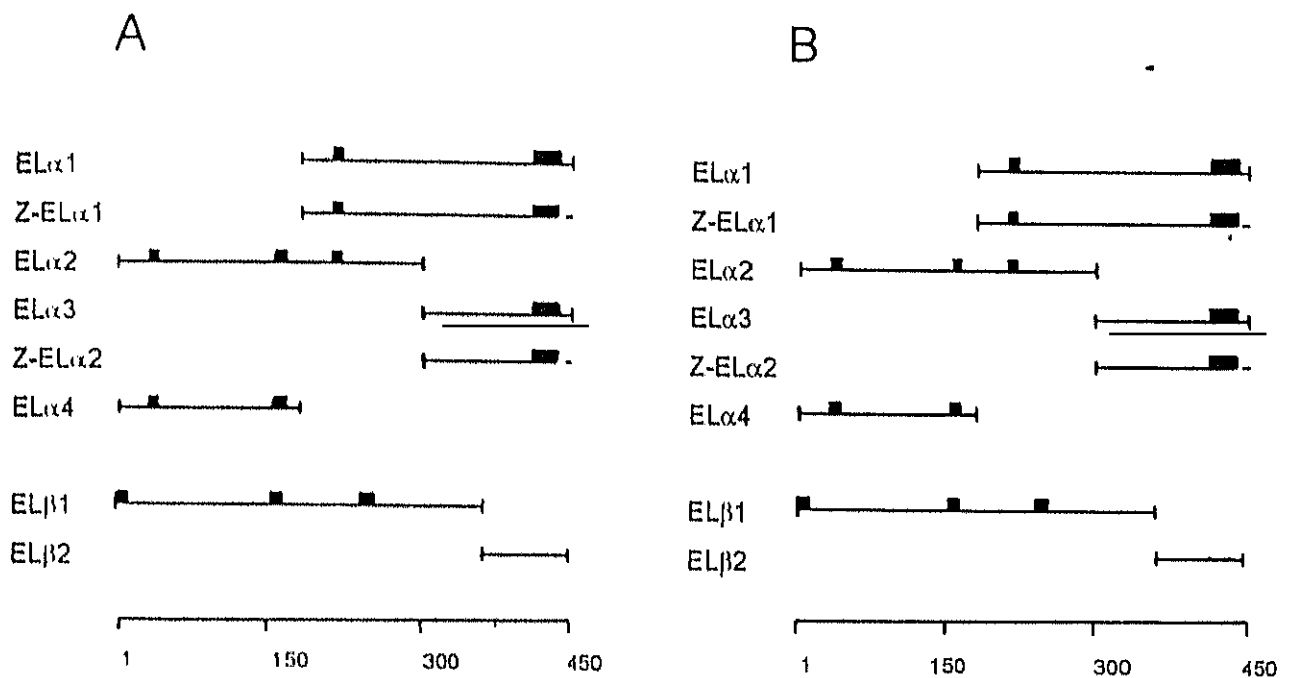


Figura 53. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con elastasa de tubulina- Zn^{2+} dimérica (A) y tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} y glicerol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítomos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos.

Tabla 26. Fragmentos de proteolisis limitada de tubulina-Zn²⁺-glicerol con Elastasa 2% (p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
EL α 1	41.3 \pm 1.4	32.9 \pm 1.4	¹⁷⁰ TAVV	179 a 451	30585
Z-EL α 1	39.1 \pm 1.4	31.2 \pm 1.4	n.d.	179 a ~445	n.d.
EL α 2	39.1 \pm 1.4	34.0 \pm 1.4	n.d.	1 a 294	32481
EL α 3	20.8 \pm 0.7	17.0 \pm 0.7	²⁹⁵ xFEPANQMVK	295 a 451	17615
Z-EL α 2	19.5 \pm 0.7	15.9 \pm 0.7	n.d.	295 a 436 \pm 8	n.d.
EL α 4	18.6 \pm 0.6	18.4 \pm 0.6	n.d.	1 a 178	19510
EL β 1	40.3 \pm 1.4	37.4 \pm 1.4	¹ MREIV	1 a 354	39326
EL β 2	19.5 \pm 0.7	13.8 \pm 0.7	³⁵⁵ DIPPxGLK	355 a 445	10547

2.6. PROTEOLISIS LIMITADA CON ENDOPROTEINASA LYS-C.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} , producido por endoproteinasa Lys-C 0.5 U/ml se muestra en la figura 54. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 55, y sus características se indican en la tabla 27.

Cadena α :

La digestión controlada de α -tubulina por endoproteinasa Lys-C se produce en dos puntos de corte mayoritarios. La digestión entre los aminoácidos K40-T41 genera los fragmentos LC α 1 y LC α 6. La proteólisis entre K280-A281 genera los fragmentos LC α 2 y LC α 5. La combinación de ambos origina el fragmento LC α 3.

Un tercer punto de corte minoritario genera el fragmento LC α 4. Las potenciales posiciones en las que se localiza este punto de corte son: K60-H61, K96-E97, K112-E113 y K124-I125.

En la tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} -glicerol se protege el punto de corte K280-A281, mientras que K40-T41 sigue siendo sensible al ataque de esta proteasa.

Cadena β :

Esta proteasa produce una débil digestión de la β -tubulina en tres puntos de corte.

Dos de estos puntos de corte se localizan en la región 290-330. En la digestión en estos puntos se producen los fragmentos LC β 1 y LC β 2, no detectándose los complementarios. La formación de estos fragmentos se reduce en la proteólisis limitada de las hojas de tubulina inducidas por Zn^{2+} -glicerol.

Un tercer punto de corte se localiza en la región 35-70, probablemente entre los residuos K58-Y59 ya que es el único residuo de Lys en esta región. Este corte origina los fragmentos LC β 3 y LC β 4 a partir de LC β 1 y LC β 2 respectivamente. Este punto de corte se protege totalmente en la forma polimerizada.

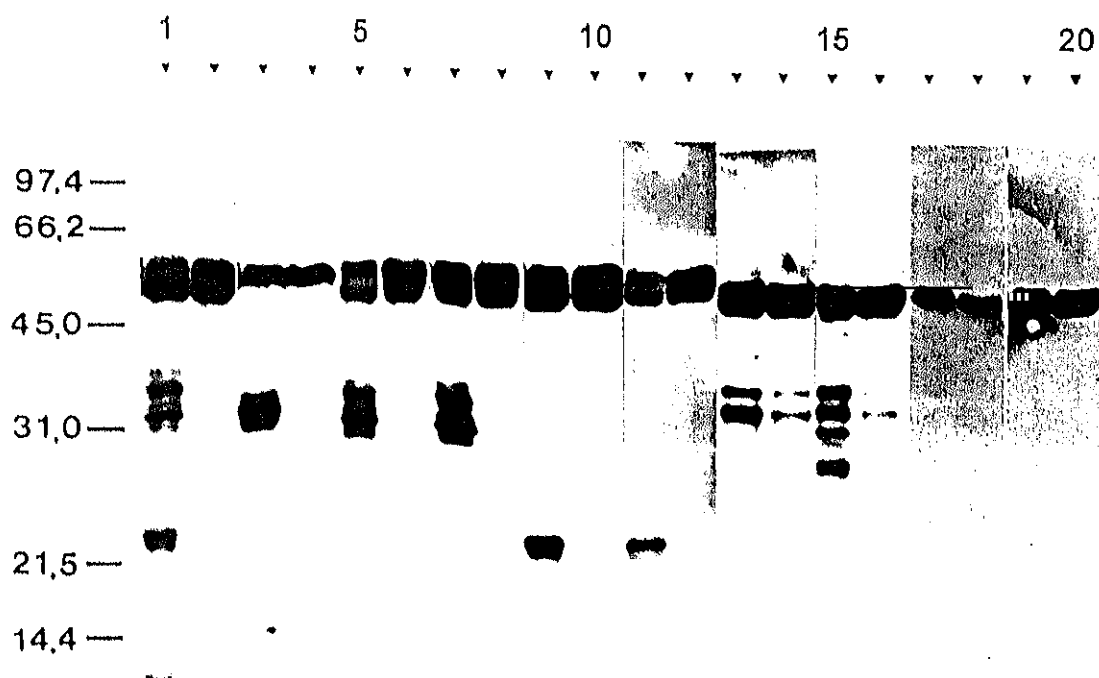


Figura 54. Proteólisis limitada con endoproteinasa Lys-C 0.5 U/ml de tubulina-Zn²⁺ en forma no ensamblada (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19) en tampón 10 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl₂, 0.3 mM ZnCl₂, 1 mM GTP, pH 6.5 y polimerizada en hojas inducidas por Zn²⁺-glicerol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20) en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl₂, 0.3 mM ZnCl₂, 1 mM GTP, pH 6.5. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 20) inmunodetección con los anticuerpos: anti α -tubulina acetilada en Lys40 (calles 3 y 4), anti α (155-168) (calles 5 y 6), anti α (214-226) (calles 7 y 8), anti α (415-443) (calles 9 y 10), anti α -tubulina tirosinada (calles 11 y 12), anti β (1-13) (calles 13 y 14), anti β (153-165) (calles 15 y 16), anti β (241-256) (calles 17 y 18) y anti β (412-431) (calles 19 y 20). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular, en kD.

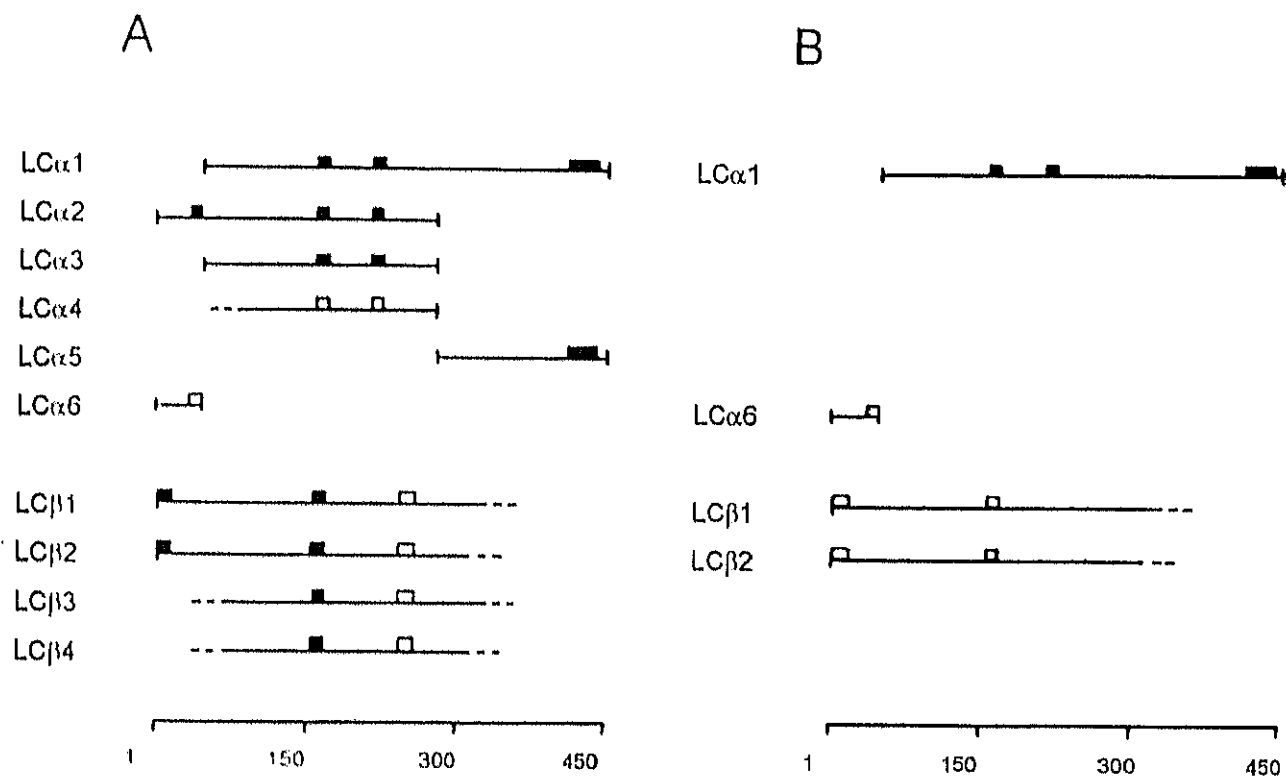


Figura 55. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con endoproteínasa Lys-C de tubulina-Zn²⁺ dimérica (A) y tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn²⁺ y glicerol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítomos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

Tabla 27. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina-Zn²⁺-glicerol con Endoproteinasa Lys-C 0.5 U/ml.

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
LC α 1	56.0 \pm 1.3	44.3 \pm 1.3	⁴¹ TIGGGDDS	41 a 451	45679
LC α 2	38.7 \pm 1.4	33.7 \pm 1.4	¹ MRExISI	1 a 280	30953
LC α 3	34.7 \pm 1.2	30.7 \pm 1.2	⁴¹ TIGGGDDS	41 a 280	26555
LC α 4	33.1 \pm 1.2	29.4 \pm 1.2	n.d.	ca. 60 a 280	n.d.
LC α 5	22.0 \pm 0.8	17.9 \pm 0.8	²⁸¹ AYxEQLxVAEI	281 a 451	19143
LC α 6	18.1 \pm 0.6	18.0 \pm 0.6	n.d.	1 a 40	4416
LC β 1	38.7 \pm 1.4	35.9 \pm 1.4	n.d.	1 a 325 \pm 10	n.d.
LC β 2	35.9 \pm 1.3	33.3 \pm 1.3	n.d.	1 a 302 \pm 10	n.d.
LC β 3	33.1 \pm 1.2	30.7 \pm 1.2	n.d.	47 \pm 15 a 325 \pm 10	n.d.
LC β 4	28.9 \pm 1.0	26.9 \pm 1.0	n.d.	57 \pm 15 a 302 \pm 10	n.d.

2.7. PROTEOLISIS LIMITADA CON SUBTILISINA.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} , producido por subtilisina 0.7% (p/p) se muestra en la figura 56. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 57, y sus características se indican en la tabla 28.

Cadena α :

La proteólisis limitada se produce en tres regiones.

Entre las posiciones A180-V181 existe un punto de corte. En posiciones cercanas a éste existe un segundo punto de corte minoritario. Por la reducción de la intensidad de las bandas de los fragmentos SB α 6 y SB α 8, estos puntos de corte se protegen apreciablemente en las hojas inducidas por Zn^{2+} -glicerol.

En la región 290-300 existe otros dos puntos de corte que origina los fragmentos SB α 3 y los complementarios SB α 5, SB α 7 y el fragmento minoritario SB α 9. Se observa una reducción apreciable en la presencia de SB α 5 y SB α 7, y no se detecta el fragmento SB α 9, en la muestra polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} -glicerol.

Por último en la región carboxilo terminal existe al menos un punto de corte. A él se debe la presencia de SB α 1, SB α 4 y SB α 7. A partir de la reactividad con el anticuerpo 1A2, frente a tubulina tirosinada, la digestión en esta zona es total en la tubulina dimérica pero se reduce significativamente en la proteólisis limitada de la tubulina polimerizada.

Cadena β :

La proteólisis limitada de la β -tubulina se produce en tres regiones de forma análoga a como ocurre en la α -tubulina. En la cadena β se observan más puntos de corte.

En la región 165-180 existen tres puntos de corte. La presencia de los fragmentos SB β 7, SB β 8, SB β 9, SB β 11 y SB β 12, producidos en la digestión en esta región, está reducida apreciablemente en la muestra polimerizada. Estos puntos de corte se protegen parcialmente en las hojas inducidas por Zn^{2+} .

En la región 280-300 existen dos puntos de corte, en los que se generan los fragmentos SB β 4, SB β 6, SB β 10 y Z-SB β 1. La producción de estos dos últimos, en la

digestión de las hojas inducidas por Zn^{2+} , está significativamente reducida, lo cual indica que la polimerización protege del ataque proteolítico estas posiciones.

En la región carboxilo terminal existen al menos dos puntos de corte. Producto de la digestión exclusiva en esta región son los fragmentos SB β 1 y el fragmento minoritario SB β 3. La digestión en esta región es prácticamente total en la forma dimérica. En la tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} -glicerol la proteólisis en estos puntos se protege parcialmente; se detecta β -tubulina sin digerir.

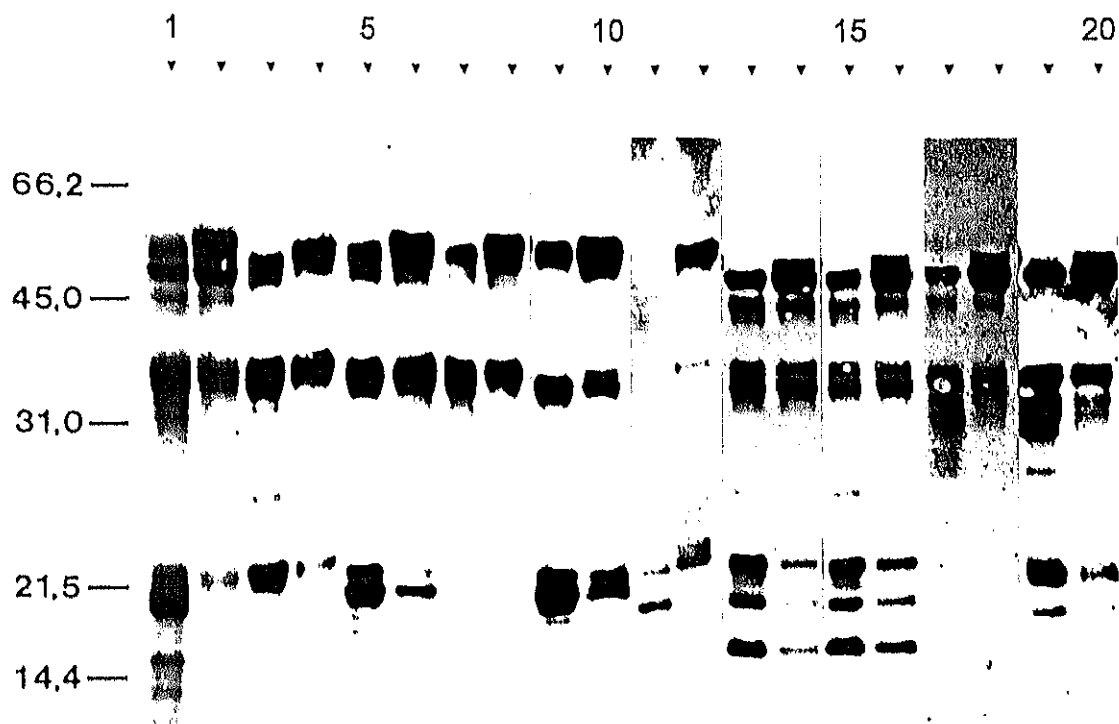


Figura 56. Proteólisis limitada con subtilisina 0.7% (p/p) de tubulina- Zn^{2+} en forma no ensamblada (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19) en tampón 10 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.3 mM ZnCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.5 y polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} -glicerol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20) en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.3 mM ZnCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.5. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 20) inmunodetección con los anticuerpos: anti α -tubulina acetilada en Lys40 (calles 3 y 4), anti α (155-168) (calles 5 y 6), anti α (214-226) (calles 7 y 8), anti α (415-443) (calles 9 y 10), anti α -tubulina tirosinada (calles 11 y 12), anti β (1-13) (calles 13 y 14), anti β (153-165) (calles 15 y 16), anti β (241-256) (calles 17 y 18) y anti β (412-431) (calles 19 y 20). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular, en kD.

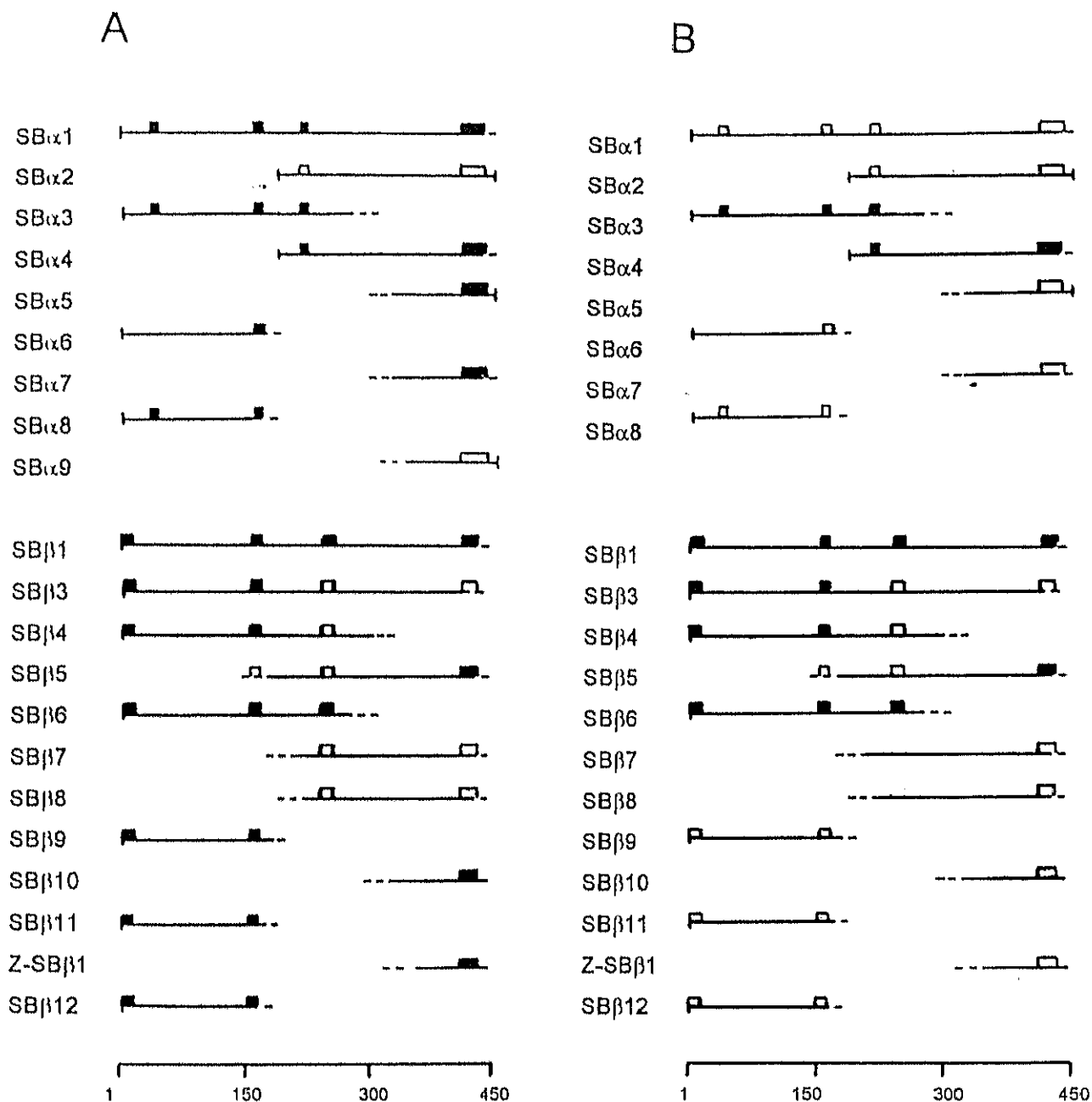


Figura 57. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con subtilisina de tubulina-Zn²⁺ dimérica (A) y tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn²⁺ y glicerol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítomos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

Tabla 28. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina-Zn²⁺-glicerol con Subtilisina 0.7% (p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
SB α 1	57.2 \pm 2.0	47.8 \pm 2.0	n.d.	1 a 430 \pm 12	n.d.
SB α 2	37.8 \pm 1.3	30.2 \pm 1.3	n.d.	181 a 451	30413
SB α 3	37.8 \pm 1.3	33.0 \pm 1.3	¹ MRExIxxH	1 a 299 \pm 10	n.d.
SB α 4	36.1 \pm 1.3	28.9 \pm 1.3	¹⁸¹ xxEPYNSI	181 a 438 \pm 10	n.d.
SB α 5	20.5 \pm 0.7	16.7 \pm 0.7	n.d.	300 \pm 7 a 451	n.d.
SB α 6	19.8 \pm 0.7	19.3 \pm 0.7	n.d.	1 a 177 \pm 7	n.d.
SB α 7	18.6 \pm 0.6	15.2 \pm 0.6	n.d.	299 \pm 5 a ca. 435	n.d.
SB α 8	18.6 \pm 0.6	18.4 \pm 0.6	n.d.	1 a 168 \pm 5	n.d.
SB α 9	18.1 \pm 0.6	14.8 \pm 0.6	n.d.	317 \pm 5 a 451	n.d.
SB β 1	53.8 \pm 1.8	49.8 \pm 1.8	n.d.	1 a 438 \pm 7	n.d.
SB β 3	49.1 \pm 1.7	45.5 \pm 1.7	n.d.	1 a 407 \pm 12	n.d.
SB β 4	39.7 \pm 1.4	36.8 \pm 1.4	n.d.	1 a 331 \pm 10	n.d.
SB β 5	37.8 \pm 1.3	33.1 \pm 1.3	n.d.	146 \pm 15 a 438 \pm 7	n.d.
SB β 6	36.9 \pm 1.3	34.2 \pm 1.3	n.d.	1 a 310 \pm 10	n.d.
SB β 7	34.5 \pm 1.2	29.6 \pm 1.2	n.d.	178 \pm 15 a 438 \pm 7	n.d.
SB β 8	32.2 \pm 1.1	27.2 \pm 1.1	n.d.	200 \pm 15 a 438 \pm 7	n.d.
SB β 9	21.1 \pm 0.7	19.7 \pm 0.7	n.d.	1 a 181 \pm 5	n.d.
SB β 10	19.8 \pm 0.7	14.1 \pm 0.7	n.d.	316 \pm 15 a 438 \pm 7	n.d.
SB β 11	18.6 \pm 0.6	17.4 \pm 0.6	n.d.	1 a 160 \pm 5	n.d.
Z-SB β 1	17.9 \pm 0.5	12.1 \pm 0.5	n.d.	334 \pm 5 a 438 \pm 7	n.d.
SB β 12	15.5 \pm 0.5	14.6 \pm 0.5	n.d.	1 a 133 \pm 5	n.d.

2.8. PROTEOLISIS LIMITADA CON PROTEINASA K.

El mapa proteolítico de $\alpha\beta$ -tubulina, dimérica y polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} , producido por proteinasa K 0.1% se muestra en la figura 58. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 59, y sus características se indican en la tabla 29.

Cadena α :

La proteinasa K digiere la α -tubulina en tres puntos.

Un corte en la región 170-190 genera en la proteólisis de la forma dimérica los fragmentos K α 6 y K α 3.

Un segundo punto de corte en la región 280-290 origina los fragmentos K α 1 y K α 5.

Los fragmentos K α 3 y K α 5 no reaccionan con el anticuerpo 1A2, que reconoce la forma tirosinada del extremo carboxilo. Existe un punto de corte en la región carboxilo terminal entre el epítipo α (415-443), que conservan estos fragmentos, y la Tyr451 del extremo carboxilo. En la α -tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} -glicerol se detectan los fragmentos K α 2 y K α 4. Corresponden a los fragmentos K α 3 y K α 5 respectivamente, cuando no son digeridos en la región carboxilo terminal y conservan este extremo intacto. Hay una protección parcial de esta región en la α -tubulina polimerizada.

Cadena β :

La digestión de la β -tubulina se produce en tres regiones análogas a las de la proteólisis limitada de α -tubulina.

En la región 160-170 se localiza un punto de corte minoritario. Genera la pareja de fragmentos K β 3 y K β 5. A partir del peso molecular aparente corregido este punto de corte debería situarse en la región 130-160. La falta de reactividad de K β 3 y K β 5 con el anticuerpo anti β (153-165) indica que el punto de corte está secuencialmente después de este epítipo. No se detecta fragmento de la región amino complementario.

En la región 280-335 se localizan 2 puntos de corte que generan dos parejas de fragmentos complementarios: K β 4 con K β 6 y K β 2 con K β 7.

En la región carboxilo terminal se localiza un punto de proteólisis limitada. A él se

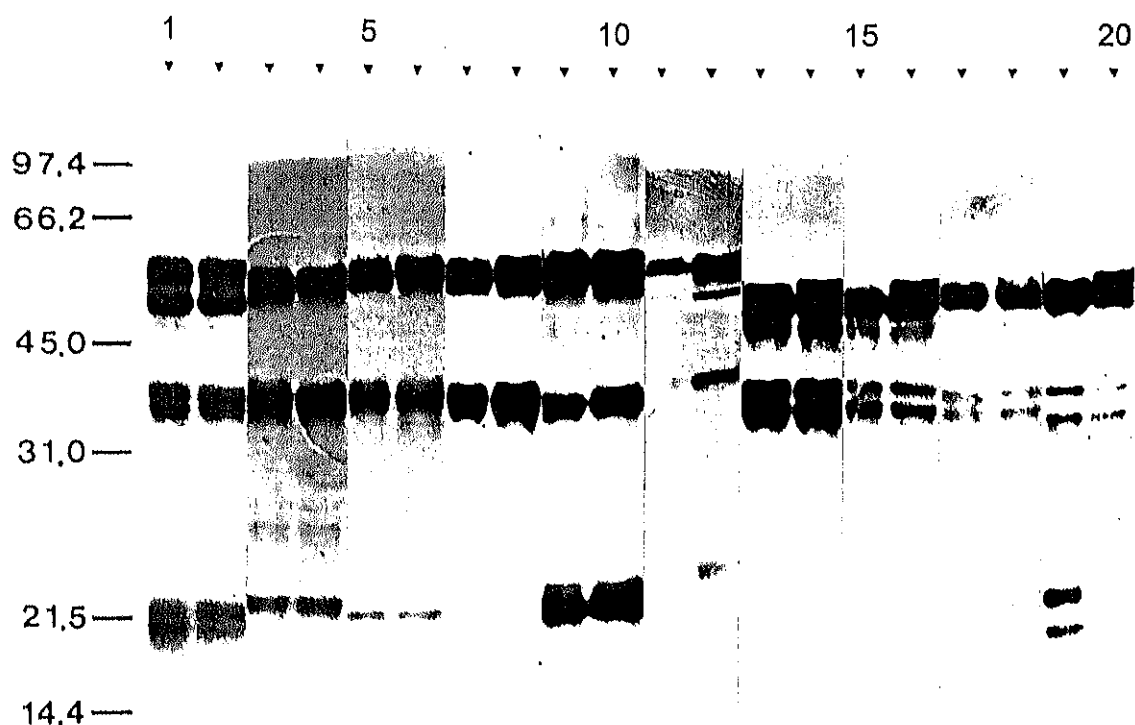


Figura 58. Proteólisis limitada con proteinasa K 0.1% (p/p) de tubulina- Zn^{2+} en forma no ensamblada (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19) en tampón 10 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.3 mM ZnCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.5 y polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} -glicerol (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20) en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl_2 , 0.3 mM ZnCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.5. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 20) inmunodetección con los anticuerpos: anti α -tubulina acetilada en Lys40 (calles 3 y 4), anti α (155-168) (calles 5 y 6), anti α (214-226) (calles 7 y 8), anti α (415-443) (calles 9 y 10), anti α -tubulina tirosinada (calles 11 y 12), anti β (1-13) (calles 13 y 14), anti β (153-165) (calles 15 y 16), anti β (241-256) (calles 17 y 18) y anti β (412-431) (calles 19 y 20). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular, en kD.

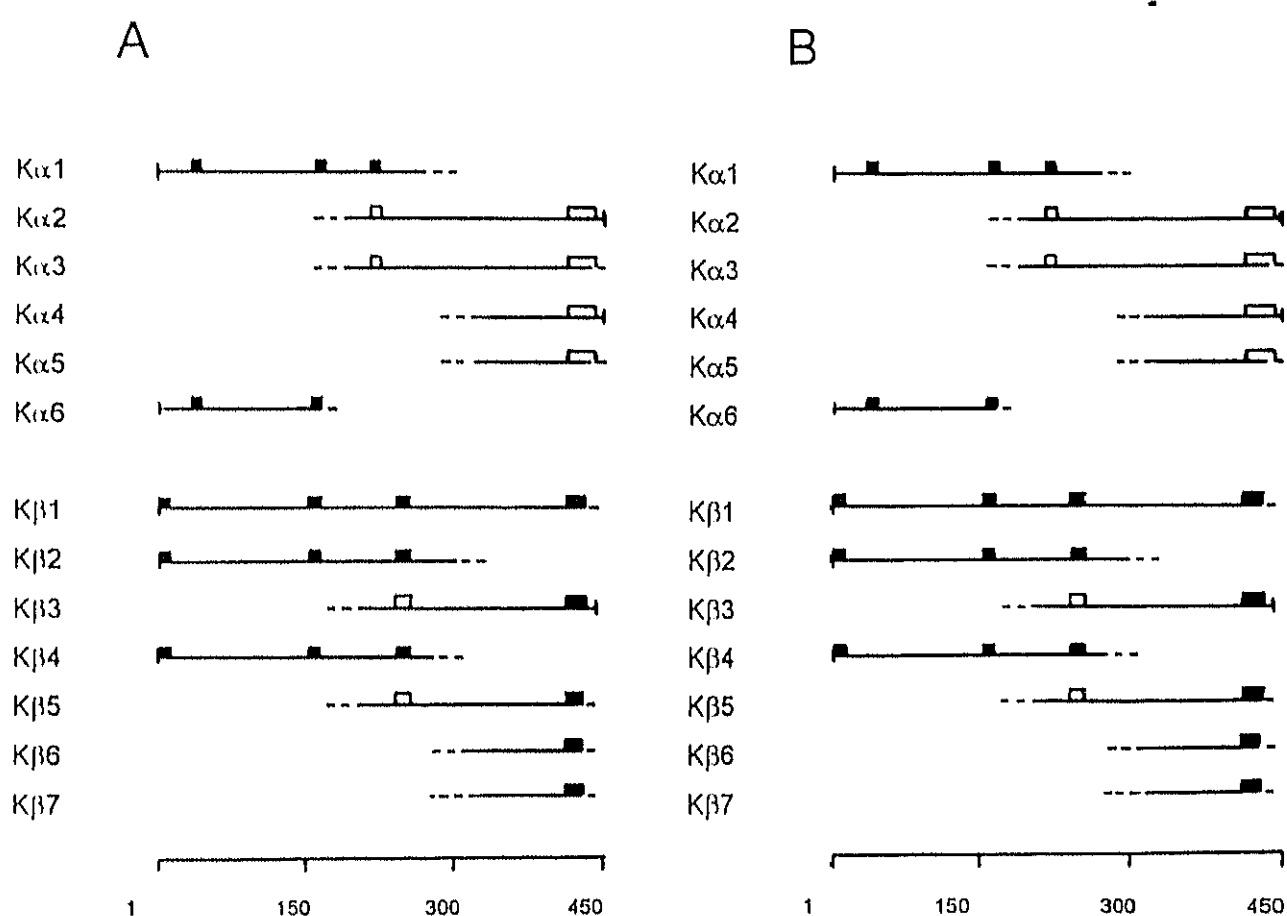


Figura 59. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con proteinasa K de tubulina-Zn²⁺ dimérica (A) y tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn²⁺ y glicerol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítomos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos, rellenos cuando la reacción es fuerte y vacíos cuando es débil.

debe la presencia del fragmento K β 1. El anticuerpo anti β (412-431) reconoce al fragmento K β 1. A pesar de la discrepancia con el peso molecular aparente, el punto de corte se sitúa entre las posiciones 431 y 445, ya que no afecta a la integridad de este epítipo. En base a la especificidad de la proteasa el corte se produce entre D436-E437. Este corte explica la presencia de K β 5 producido a partir de K β 3 por digestión en esta región. No se detecta duplicidad en las bandas K β 6 y K β 7.

El patrón de proteólisis limitada de la β -tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn²⁺-glicerol es similar al de la forma dimérica. Los fragmentos K β 6 y K β 7 se detectan muy débilmente, sin embargo la presencia de sus complementarios K β 4 y K β 2 no se reduce.

Tabla 29. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina-Zn²⁺-glicerol con Proteínasa K 0.1% (p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
K α 1	38.7 \pm 1.4	33.7 \pm 1.4	n.d.	1 a 304 \pm 10	n.d.
K α 2	37.5 \pm 1.3	29.9 \pm 1.3	n.d.	183 \pm 10 a 451	n.d.
K α 3	36.9 \pm 1.3	29.5 \pm 1.3	n.d.	180 \pm 15 a ca. 445	n.d.
K α 4	19.7 \pm 0.7	16.1 \pm 0.7	n.d.	307 \pm 8 a 451	n.d.
K α 5	18.8 \pm 0.7	15.4 \pm 0.7	n.d.	306 \pm 15 a ca. 445	n.d.
K α 6	18.2 \pm 0.6	18.1 \pm 0.6	n.d.	1 a 166 \pm 8	n.d.
K β 1	48.5 \pm 1.7	44.9 \pm 1.7	n.d.	1 a 436	48779
K β 2	38.7 \pm 1.3	35.9 \pm 1.3	n.d.	1 a 325 \pm 10	n.d.
K β 3	38.1 \pm 1.3	33.5 \pm 1.3	n.d.	149 \pm 12 a 445	n.d.
K β 4	35.8 \pm 1.2	33.2 \pm 1.2	n.d.	1 a 301 \pm 10	n.d.
K β 5	34.6 \pm 1.2	29.8 \pm 1.2	n.d.	138 \pm 15 a 436	n.d.
K β 6	18.8 \pm 0.7	13.0 \pm 0.7	n.d.	289 \pm 10 a 436	n.d.
K β 7	16.8 \pm 0.6	10.9 \pm 0.6	n.d.	307 \pm 10 a 436	n.d.

2.9. PROTEOLISIS LIMITADA CON ENDOPROTEINASA ASP-N.

El mapa proteolítico de β -tubulina, dimérica y polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} , producido por endoproteinasa Asp-N 0.06% se muestra en la figura 60. La interpretación de los fragmentos producidos se muestra en la figura 61, y sus características se indican en la tabla 30.

La proteólisis limitada de tubulina con endoproteinasa Asp-N produce un único fragmento, detectado en SDS-PAGE, de β -tubulina. El corte que lo origina se localiza en la proximidad del extremo carboxilo. Existen dos posibles localizaciones: Q426-D427 y A430-D431, siendo más probable la segunda (ver antes). Este punto de corte es sensible en la forma dimérica y en la tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} -glicerol.

Tabla 30. Fragmentos de proteólisis limitada de tubulina- Zn^{2+} -glicerol con Endoproteasa Asp-N 0.06% (p/p).

Nombre	PMap (kD)	PMcor (kD)	Secuencia N-Terminal	Posición	PM teórico (D)
DN β 1	51.3 \pm 1.8	47.5 \pm 1.8	n.d.	1 a c.a. 430	48246*

* Suponiendo que DN β 1 corresponde a la región β (1-430).

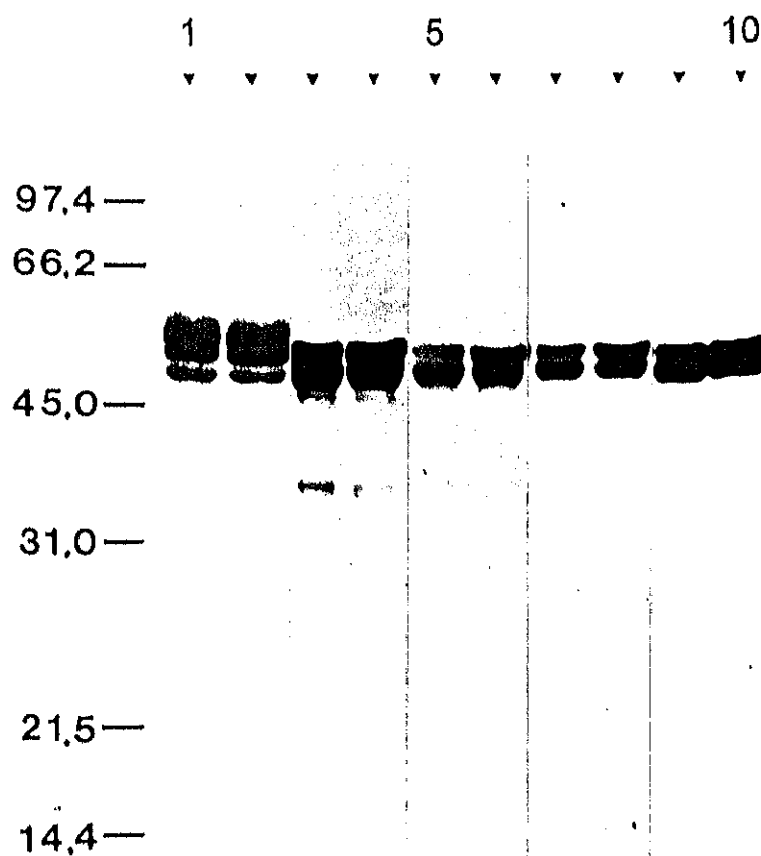


Figura 60. **Proteólisis limitada con endoproteinasa Asp-N 0.06% (p/p) de tubulina-Zn²⁺** en forma no ensamblada (calles 1, 3, 5, 7 y 9) en tampón 10 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl₂, 0.3 mM ZnCl₂, 1 mM GTP, pH 6.5 y polimerizada en hojas inducidas por Zn²⁺-glicerol (calles 2, 4, 6, 8 y 10) en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM MgCl₂, 0.3 mM ZnCl₂, 1 mM GTP, pH 6.5. (calles 1 y 2) tinción con azul de coomassie. (calles 3 a 10) Inmunodetección con los anticuerpos: anti β (1-13) (calles 3 y 4), anti β (153-165) (calles 5 y 6), anti β (241-256) (calles 7 y 8) y anti β (412-431) (calles 9 y 10). A la izquierda del panel se indica la posición de los patrones de peso molecular, en kD.

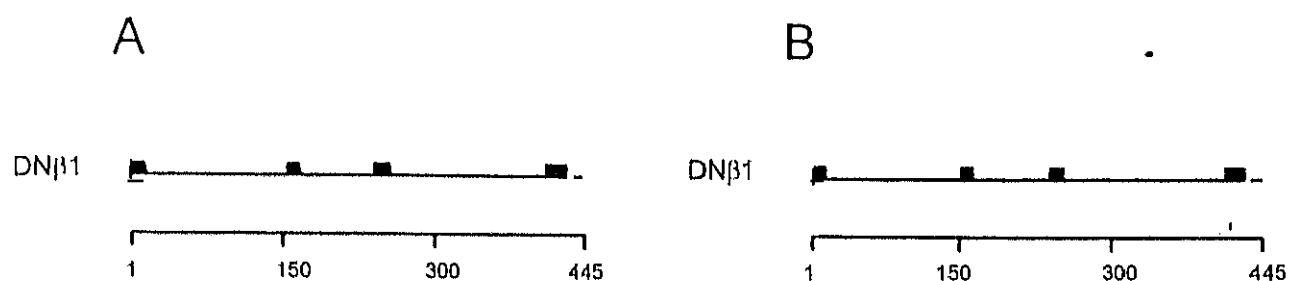


Figura 61. Esquema de los fragmentos producidos en la proteólisis limitada con endoproteínasa Asp-N de tubulina- Zn^{2+} dimérica (A) y tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} y glicerol (B). Los rectángulos sobre los fragmentos señalan los epítomos de los anticuerpos que reconocen a los fragmentos.

3. PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA DE TUBULINAS.

No se ha detectado ninguna proteína, de estructura tridimensional conocida, con suficiente semejanza de secuencia con las tubulinas, que permita la predicción de la estructura de éstas mediante homología.

La predicción de estructura secundaria por el método PHD se ha realizado a partir del alineamiento múltiple de 177 secuencias de tubulinas. La predicción tiene un grado de confianza superior al 82% para el 66.1% de los residuos de α -tubulina y para el 62.3% de los de β -tubulina.

El contenido estimado de cada tipo de estructura secundaria en α -tubulina es: 32.8% de hélice, 20.6% de lámina β y 46.6% de bucles. En β -tubulina: 35.7% de hélice, 21.6% de lámina β y 42.7% de giros y bucles. El contenido medio de ambas cadenas es: 34.3% de hélice, 21.1% de lámina β y 44.6% de giros. Según estos valores las tubulinas se clasifican como proteínas tipo α/β .

3.1. PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA DE α -TUBULINA.

En α -tubulina se ha estimado la presencia de 11 hélices y 15 segmentos extendidos de lámina β . Estos elementos se alternan a lo largo de la secuencia, si bien la hélices se localizan más abundantemente en la segunda mitad de la cadena (figura 62). Los elementos de estructura secundaria, su extensión y dimensiones teóricas, se enumeran en la tabla 31.

En las hélices y láminas β , las posiciones para las que el grado de confianza de la predicción es menor del 82% se localizan en los extremos de las mismas. La ambigüedad se limita a la extensión de los elementos de estructura secundaria, pero no a su integridad.

Frecuentemente las α -hélices son anfipáticas, presentando predominantemente las cadenas apolares en un lado del cilindro de la hélice y las polares en el lado opuesto. El carácter anfipático de las hélices de α -tubulina se ha estudiado mediante dos métodos. La estimación del momento hidrofóbico para un ángulo de rotación en torno a 100° da información cuantitativa sobre la anfipaticidad de una secuencia que adopte este tipo de estructura (figura 63). Según los valores calculados del momento hidrofóbico, los segmentos

Tabla 31. Elementos de estructura secundaria en α -tubulina de cerebro porcino.

Elemento estructural	Nombre	Posición ^a	Longitud ^b (Å)
Bucle		1-2	
Lámina β	$\alpha E1$	3-7(8)	16.5 (19.8)
Bucle		9-14	
Hélice α	$\alpha H1$	(15)18-22(25)	7.5 (16.5)
Bucle		(26)28-46(47)	
Lámina β	$\alpha E2$	(48)49-54(55)	19.8 (26.4)
Bucle		56-61(63)	
Lámina β	$\alpha E3$	(64)65-68(69)	13.2 (19.8)
Bucle		70-108	
Hélice α	$\alpha H2$	(109)111-125(126)	22.5 (27.0)
Bucle		(127)128-130(133)	
Lámina β	$\alpha E4$	(134)135-139(140)	16.5 (23.1)
Bucle		(141)142-143(144)	
Hélice α	$\alpha H3$	(145)146-160	22.5 (24.0)
Bucle		161-163(164)	
Lámina β	$\alpha E5$	(165)166-172	23.1 (26.4)
Bucle		173-178(179)	
Lámina β	$\alpha E6$	(180)181-183	9.9 (13.2)
Bucle		(184)185-186(187)	
Lámina β	$\alpha E7$	(188-191)	13.2
Lámina β	$\alpha E8$	(193)195(196)	13.2
Bucle		(197)198-199	
Lámina β	$\alpha E9$	(200)201-202(204)	6.6 (16.5)
Hélice α	$\alpha H4$	(206)207-215	13.5 (15.0)
Bucle		(216)218-224(225)	
Hélice α	$\alpha H5$	(226)227-233(234)	10.5 (13.5)
Lámina β	$\alpha E10$	(235)239-243	16.5 (29.7)
Bucle		(244)245-248	
Hélice α	$\alpha H6$	249-258	15.0
Bucle		(259)260-263(266)	
Lámina β	$\alpha E11$	(267-270)	(13.2)
Bucle		(271-288)	
Hélice α	$\alpha H7$	289-295	10.5
Bucle		296-297(298)	
Hélice α	$\alpha H8$	299-300(303)	3.0 (7.5)
Bucle		(304)306-308(313)	
Lámina β	$\alpha E12$	(314)315-318(319)	13.2 (19.8)
Bucle		(320)323-324	
Hélice α	$\alpha H9$	(325)326-336	16.5 (18.0)
Bucle		337-340	
Lámina β	$\alpha E13$	(341)342-346	16.5 (19.8)
Bucle		(347)348(353-357)367(370)	
Lámina β	$\alpha E14$	(371)372-378	23.1 (26.4)
Bucle		(379)-380	
Hélice α	$\alpha H10$	(381)382-402(404)	31.5 (36.0)
Lámina β	$\alpha E15$	(405-408)	13.2
Bucle		(409)412-414	
Hélice α	$\alpha H11A$	415-436	33.0
Hélice α	$\alpha H11B$	(437-441)	(7.5)
Bucle		(442)444(446-448)451	

^a Entre paréntesis se indican las posiciones en las que se extienden los elementos estructurales cuya predicción tiene un grado de confianza inferior al 82%.

^b Extensión de la región de los elementos estructurales cuya predicción tiene un grado de confianza superior al 82%. Entre paréntesis se indica la extensión total.

con predicción de estructura de hélice α se pueden clasificar en grupos:

(a) Hélices α con un valor del momento hidrofóbico significativamente elevado, por encima del valor medio de toda la proteína, a lo largo de toda su extensión. Son hélices potencialmente anfipáticas. En este grupo se incluyen: $\alpha H2$ y $\alpha H5$.

(b) Hélices α con un valor del momento hidrofóbico elevado solamente en una parte de su extensión. Incluye: $\alpha H1$, $\alpha H3$, $\alpha H4$, $\alpha H6$, $\alpha H7$, $\alpha H10$ y $\alpha H11A$.

(c) Hélices α con un valor del momento hidrofóbico bajo. Son hélices claramente no anfipáticas, y se incluyen en este grupo: $\alpha H8$ y $\alpha H9$.

Como segunda aproximación al estudio de la anfipaticidad de las hélices, y de forma más general su grado de exposición al solvente, se ha empleado un método gráfico. Se ha representado la proyección de los aminoácidos sobre un plano perpendicular al eje de la hélice, y se ha estudiado la distribución de la accesibilidad del solvente a los residuos (figura 64).

Hélice $\alpha H1$.

A pesar de no tener un valor de momento hidrofóbico claro, presenta una distribución asimétrica de la accesibilidad de los aminoácidos al solvente. Es una hélice potencialmente anfipática, con predominio del carácter ocluído de sus residuos.

Hélice $\alpha H2$.

La región 109-126 presenta una fuerte predicción de hélice, que tiene entre 4 y 5 vueltas. Tiene un elevado valor del momento hidrofóbico a lo largo de toda su extensión. Gráficamente se aprecia un carácter anfipático, con predominio de los residuos expuestos.

Hélice $\alpha H3$.

Esta hélice se localiza tras la región rica en Gly característica de las tubulinas, de la cual contiene el final. Los 10 primeros aminoácidos, 145-154, están ocluídos potencialmente y tienen un valor del momento hidrofóbico significativamente elevado. Los 6 últimos, 155-160, están predominantemente expuestos y en ellos el momento hidrofóbico decae. La hélice está orientada con la región amino hacia el interior y con el final carboxilo hacia la superficie.

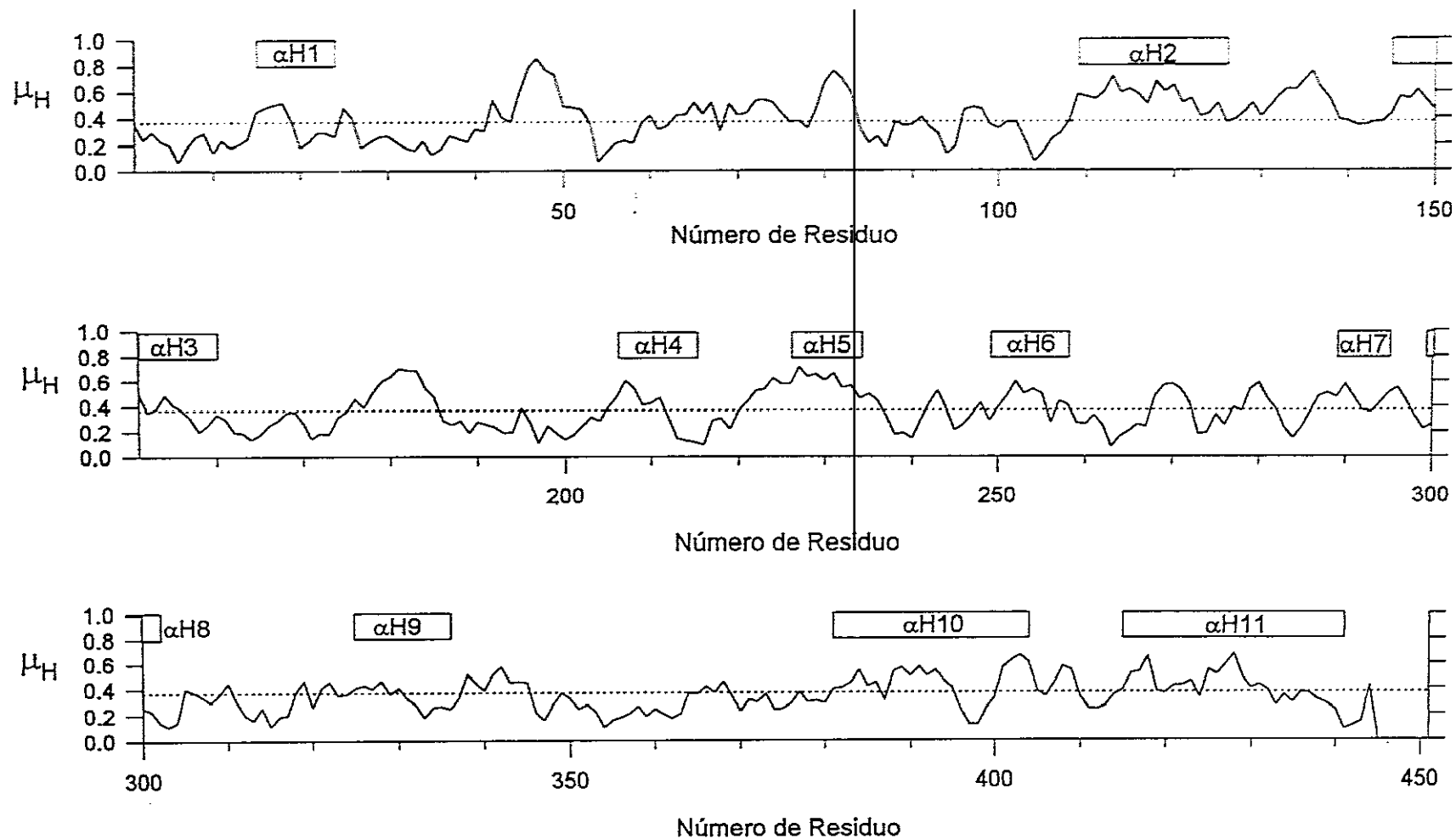


Figura 63. **Momento hidrofóbico (μ_H)** de la secuencia de α -tubulina de cerebro porcino, calculado para un ángulo de rotación entre 95° y 105° correspondiente a una estructura de hélice α . Las cajas indican la posición de los elementos de hélice α predichos para esta secuencia. La línea de puntos indica el valor medio observado.

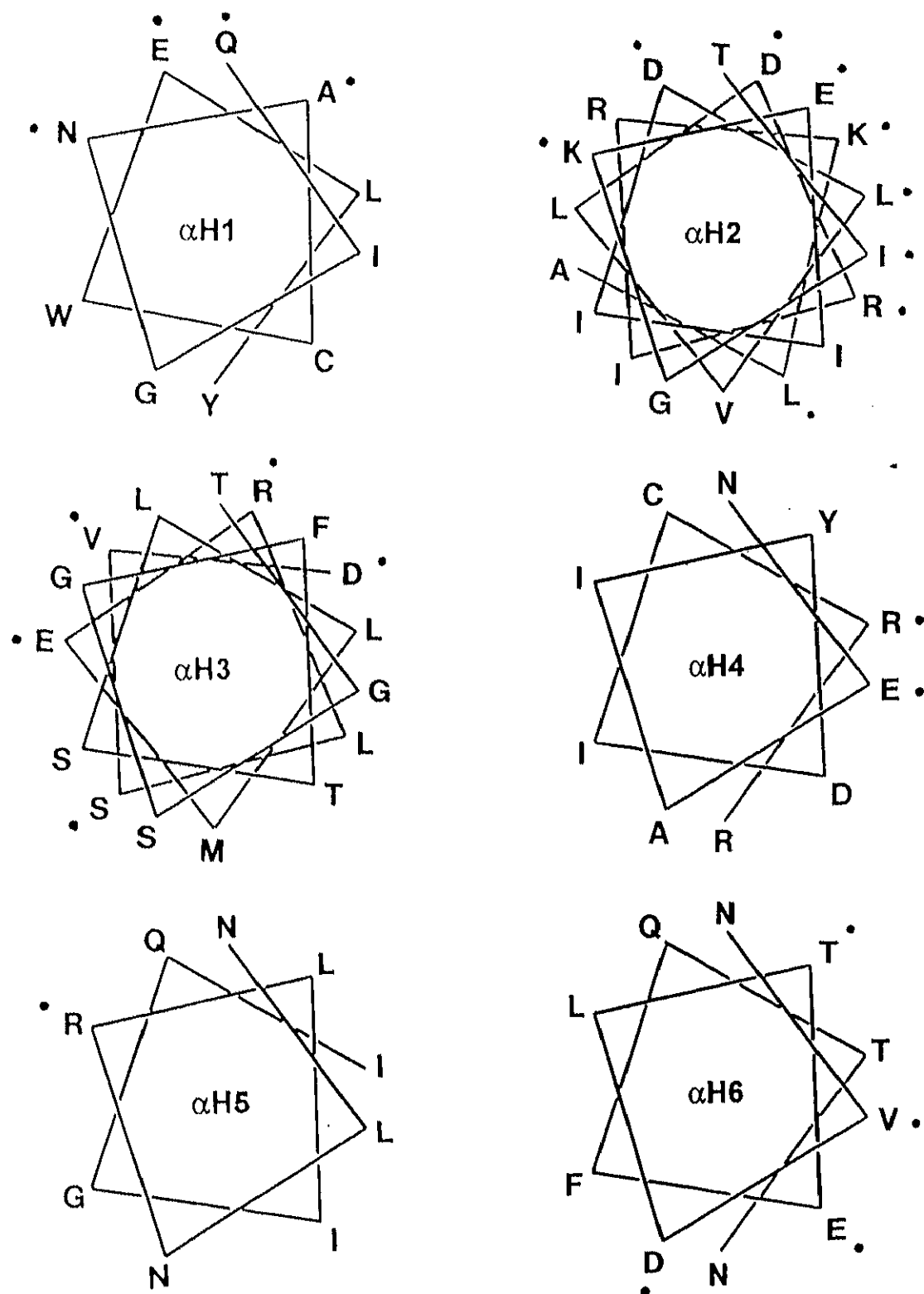


Figura 64. Segmentos de α -tubulina para los que se predice estructura helicoidal (ver tabla 31). Se representan los residuos proyectados en el plano perpendicular al eje de la hélice. Los residuos se indican con el código de una letra; los puntos junto a ciertos residuos indican que están expuestos al solvente según la predicción de accesibilidad.

Hélice α H4.

Los aminoácidos de esta hélice están mayoritariamente ocluidos. La hélice se localiza en el interior de la proteína.

Hélice α H5.

Esta hélice se localiza en una zona con elevado valor de momento hidrofóbico. Sin embargo al igual que α H4, predomina el carácter ocluido en la predicción de accesibilidad. En base a esta última esta hélice está ocluida en el interior de la proteína.

Hélice α H6.

La accesibilidad de los residuos de esta hélice está distribuida asimétricamente, pero no tiene un marcado carácter anfipático. La Thr257 y Asn258, que está ocluidos, se localizan en la cara expuesta de la hélice.

Hélice α H7.

Esta hélice de 2 vueltas tiene un marcado carácter anfipático. Se sitúa en la superficie exterior de la proteína.

Hélice α H8.

Es una pequeña hélice con valores de momento hidrofóbico bajos, en la que no se aprecia un carácter anfipático.

Hélice α H9.

Predomina el carácter expuesto al solvente de sus residuos, lo que la sitúa en la superficie de la proteína. Los valores de momento hidrofóbico asignados son bajos, a pesar de ello los pocos residuos ocluidos se localizan en la misma cara de la hélice, definiendo una pequeña zona hidrofóbica de contacto.

Hélice α H10.

Esta región, 381-404, tiene una marcada predicción helicoidal y corresponde a una hélice de 6 a 7 vueltas. No se detecta ningún punto interior en el que la predicción de hélice

sea menor y en el que pudiera dividirse. El momento hidrofóbico es significativamente elevado en la primera mitad y tiene un máximo marcado en los últimos 5 residuos. Asimismo hay una cierta asimetría en la distribución espacial de las accesibilidad, pero no presenta un marcado carácter anfipático.

Hélice α H11.

La región 415-441, es el segmento más largo con predicción de hélice. Se distinguen dos regiones: α H11A y α H11B. α H11A se extiende de 315 a 436. El momento hidrofóbico de esta primera zona, sin ser muy elevado, presenta dos máximos significativos. Es una zona rica en residuos ácidos, Asp y Glu, con elevada accesibilidad del solvente, pero se observan residuos con baja accesibilidad que están agrupados en el mismo lado de la hélice, confirmando un carácter anfipático. α H11B se extiende de 437 a 442, en esta zona el potencial de hélice α es menor, y en ella todos los residuos están expuestos.

3.2. PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA DE β -TUBULINA.

La predicción de estructura secundaria de β -tubulina indica la presencia de 12 hélices y 18 regiones de lámina β extendida. En conjunto la predicción de estructura secundaria de β -tubulina es similar a la de α -tubulina (figura 65). Los elementos de estructura secundaria, su extensión y dimensiones teóricas, se enumeran en la tabla 32.

En β -tubulina se aprecia una hélice más que en α . La región en α -tubulina homóloga a la de la hélice β H9, formada por 4 residuos, es una zona desordenada que une la hélice α H8 con el segmento extendido α E12.

Respecto a α -tubulina, se predicen 3 nuevos segmentos con estructura extendida de lámina β : β E4, β E5 y β E16. Son pequeñas regiones de 3 residuos de extensión. En las zonas homólogas en α -tubulina se observan residuos aislados a los que se asigna estructura extendida con baja probabilidad. En β -tubulina hay un aumento de la probabilidad de encontrar lámina β en estas 3 regiones, que ya tenían este carácter estructural en α -tubulina, aunque poco definido.

De forma análoga a como se ha hecho con la cadena α , se ha estudiado con detalle

Tabla 32. Elementos de estructura secundaria en β -tubulina de cerebro porcino.

Elemento estructural	Nombre	Posición ^a	Longitud ^b (Å)
Bucle		1	
Lámina β	$\beta E1$	(2)3-8(9)	19.8(26.4)
Bucle		(9)10-11(13)	
Hélice α	$\beta H1$	(14)18-23(26)	9.0 (19.5)
Bucle		(27)28-44(45)	
Lámina β	$\beta E2$	(46)47-52(53)	19.8(26.4)
Bucle		54-58(61)	
Lámina β	$\beta E3$	(62)63-66(67)	13.2(19.8)
Bucle		68(74-77)81(82)	
Lámina β	$\beta E4$	(83-85)	(9.9)
Bucle		86-88(89)	
Lámina β	$\beta E5$	(90-92)	(9.9)
Bucle		(93)94(98)(101)(103)104(118)	
Hélice α	$\beta H2$	(109)110-123(124)	21.0 (24.0)
Bucle		(125)126-127(131)	
Lámina β	$\beta E6$	(132)133137(138)	16.5(23.1)
Bucle		(139)140-141(142)	
Hélice α	$\beta H3$	(143)144-158	22.5 (24.0)
Bucle		159-162	
Lámina β	$\beta E7$	(163)164-170	23.1(26.4)
Bucle		(171)172176(178)	
Lámina β	$\beta E8$	179-180(182)	6.6(13.2)
Bucle		183-184(185)	
Lámina β	$\beta E9$	(186)188(189)	(13.2)
Bucle		(190)	
Lámina β	$\beta E10$	(191)192-193(194)	6.6(13.2)
Bucle		(195)196-197	
Lámina β	$\beta E11$	198-201(202)	13.2(16.5)
Bucle		(203-204)	
Hélice α	$\beta H4$	205-213	13.5
Bucle		(214)215-222(223)	
Hélice α	$\beta H5$	(224)225-231(234)	10.5 (16.5)
Lámina β	$\beta E12$	(235)237-240	13.2(19.8)
Bucle		(242)243-245(246)	
Hélice α	$\beta H6$	247-256	15.0
Bucle		(257)258-262(264)	
Lámina β	$\beta E13$	(265-268)	(13.2)
Bucle		(269)271(272-274)276(286)	
Hélice α	$\beta H7$	(287)288-293	9.0 (10.5)
Bucle		(294)295(296)	
Hélice α	$\beta H8$	297-298(301)	3.0 (7.5)
Bucle		(302)304-306(308)	
Hélice α	$\beta H9$	(309-312)	6.0
Lámina β	$\beta E14$	(313)314-316(317)	9.9(16.5)
Bucle		(318)322	
Hélice α	$\beta H10$	(323)324-333(334)	15.0 (18.0)

^a Entre paréntesis se indican las posiciones en las que se extienden los elementos estructurales cuya predicción tiene un grado de confianza inferior al 82%.

^b Extensión de la región de los elementos estructurales cuya predicción tiene un grado de confianza superior al 82%. Entre paréntesis se indica la extensión total.

Tabla 32 (continuación). Elementos de estructura secundaria en β -tubulina de cerebro porcino.

Elemento estructural	Nombre	Posición ^a	Longitud ^b (Å)
Bucle		335-338	
Lámina β	β E15	(339)340-344	16.5(19.8)
Bucle		(345)346-349(350)	
Lámina β	β E16	(351-353)	(9.9)
Bucle		(354)357-359(363)	
Lámina β	β E17	(364)365-368(369)	13.2(19.8)
Bucle		370	
Hélice α	β H11	(371)372-392(394)	31.5 (36.0)
Lámina β	β E18	(395-400)	(19.8)
Bucle		(401)402-403(404)	
Hélice α	β H12A	405(407-408)427(429)	(37.5)
Hélice α	β H12B	(430-438)	(13.5)
Bucle		(439)443-445	

^a Entre paréntesis se indican las posiciones en las que se extienden los elementos estructurales cuya predicción tiene un grado de confianza inferior al 82%.

^b Extensión de la región de los elementos estructurales cuya predicción tiene un grado de confianza superior al 82%. Entre paréntesis se indica la extensión total.

la exposición al solvente y la anfipaticidad potencial de las hélices α potenciales. En el estudio del momento hidrofóbico, calculado para una conformación helicoidal, destaca la poca conservación entre los resultados obtenidos para α - y β -tubulina (figura 66). Sí parecen estar más conservados los valores de accesibilidad del solvente y su patrón de repetición, indicando este último el carácter anfipático de ciertas estructuras (figura 67). Seguidamente se detallan las características de las zonas de β -tubulina con estructura helicoidal.

Hélice β H1.

Presenta unos valores de momento hidrofóbico superiores a su equivalente de la cadena α , α H1, pero como en esta decaen al final de esta zona. Coincide con α H1 en presentar una distribución asimétrica de la accesibilidad del solvente y por lo tanto presenta carácter anfipático.

Hélice β H2.

El valor del momento hidrofóbico calculado para esta hélice es elevado, pero a diferencia de su equivalente α H2, este valor decae en su segunda mitad. Sin embargo gráficamente se aprecia una clara presencia de dos lados en la hélice, con opuesta accesibilidad, lo cual indica un marcado carácter anfipático.

Hélice β H3.

El valor del momento hidrofóbico para esta zona es bajo en la primera mitad y elevado en la segunda. En la representación gráfica tampoco se aprecia una clara asimetría en la distribución espacial de la accesibilidad del solvente. En cambio se detecta asimetría en la distribución secuencial de la accesibilidad. Los 10 primeros residuos tienen un carácter oculto y en los 6 últimos predomina el carácter expuesto. Según esto la hélice β H3 está orientada con el extremo amino en el interior de la proteína y el carboxilo en la superficie.

Hélice β H4.

Hay un predominio de valores bajos de accesibilidad del solvente asignado a los residuos de esta hélice. Los valores de momento hidrofóbico son poco elevados en la primera mitad y decaen bruscamente en la segunda. Potencialmente se localiza en el interior de la

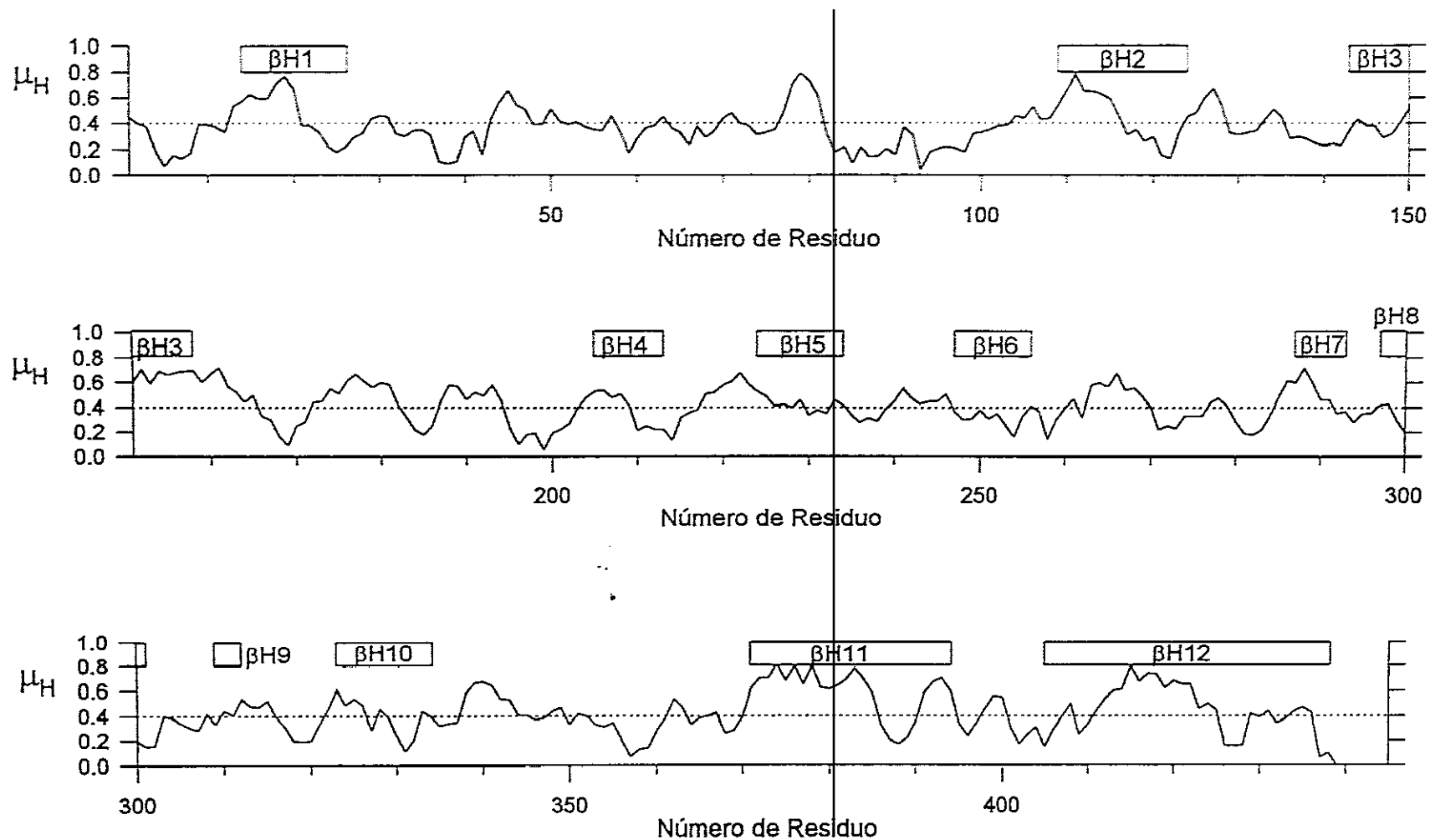


Figura 66. **Momento hidrofóbico** (μ_H) de la secuencia de β -tubulina de cerebro porcino, calculado para un ángulo de rotación entre 95° y 105° correspondiente a una estructura de hélice α . Las cajas indican la posición de los elementos de hélice α predichos para esta secuencia. La línea de puntos indica el valor medio observado.

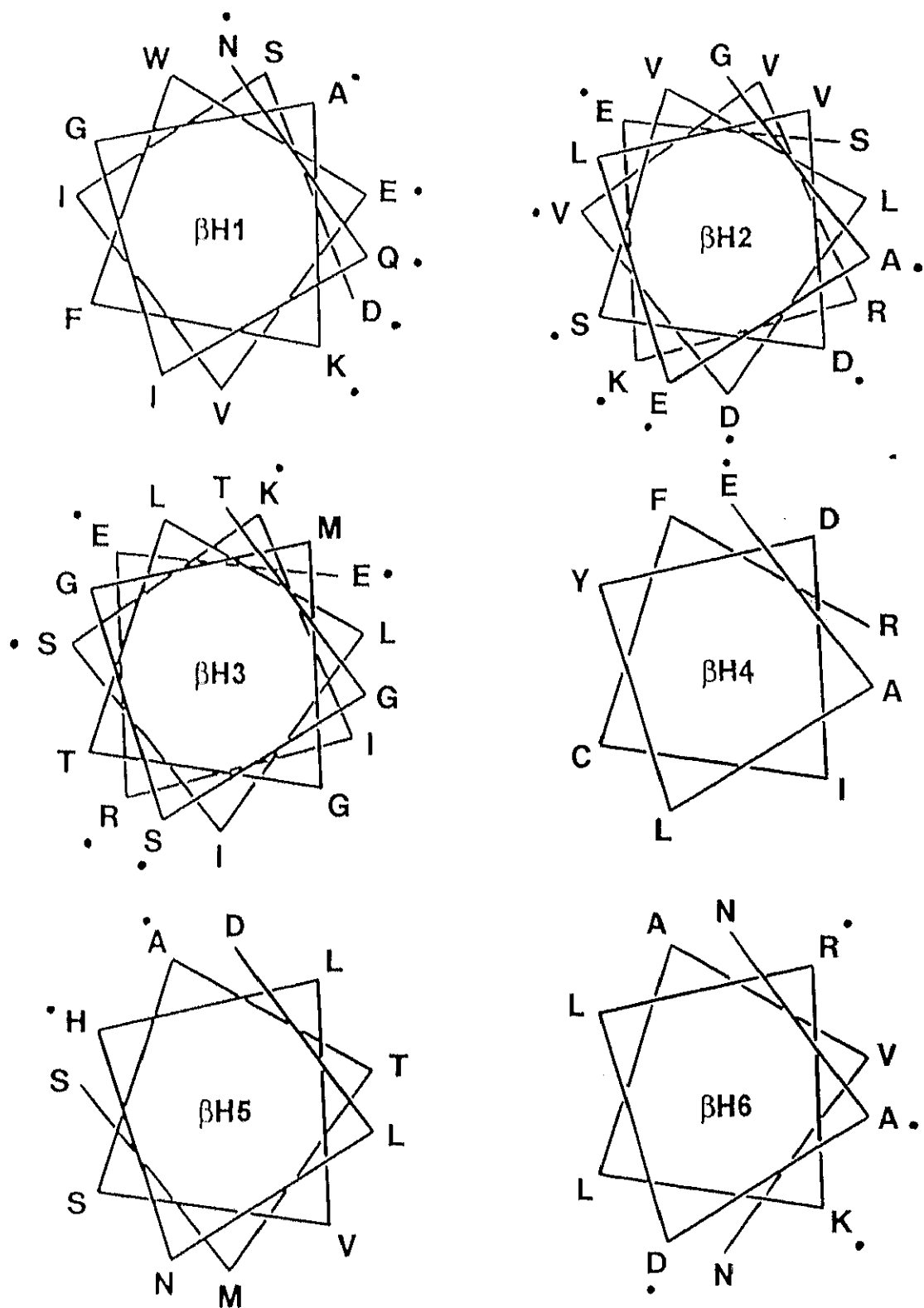


Figura 67. Segmentos de β -tubulina para los que se predice estructura helicoidal (ver tabla 32). Se representan los residuos proyectados en el plano perpendicular al eje de la hélice. Los residuos se indican con el código de una letra; los puntos junto a ciertos residuos indican que están expuestos al solvente según la predicción de accesibilidad.

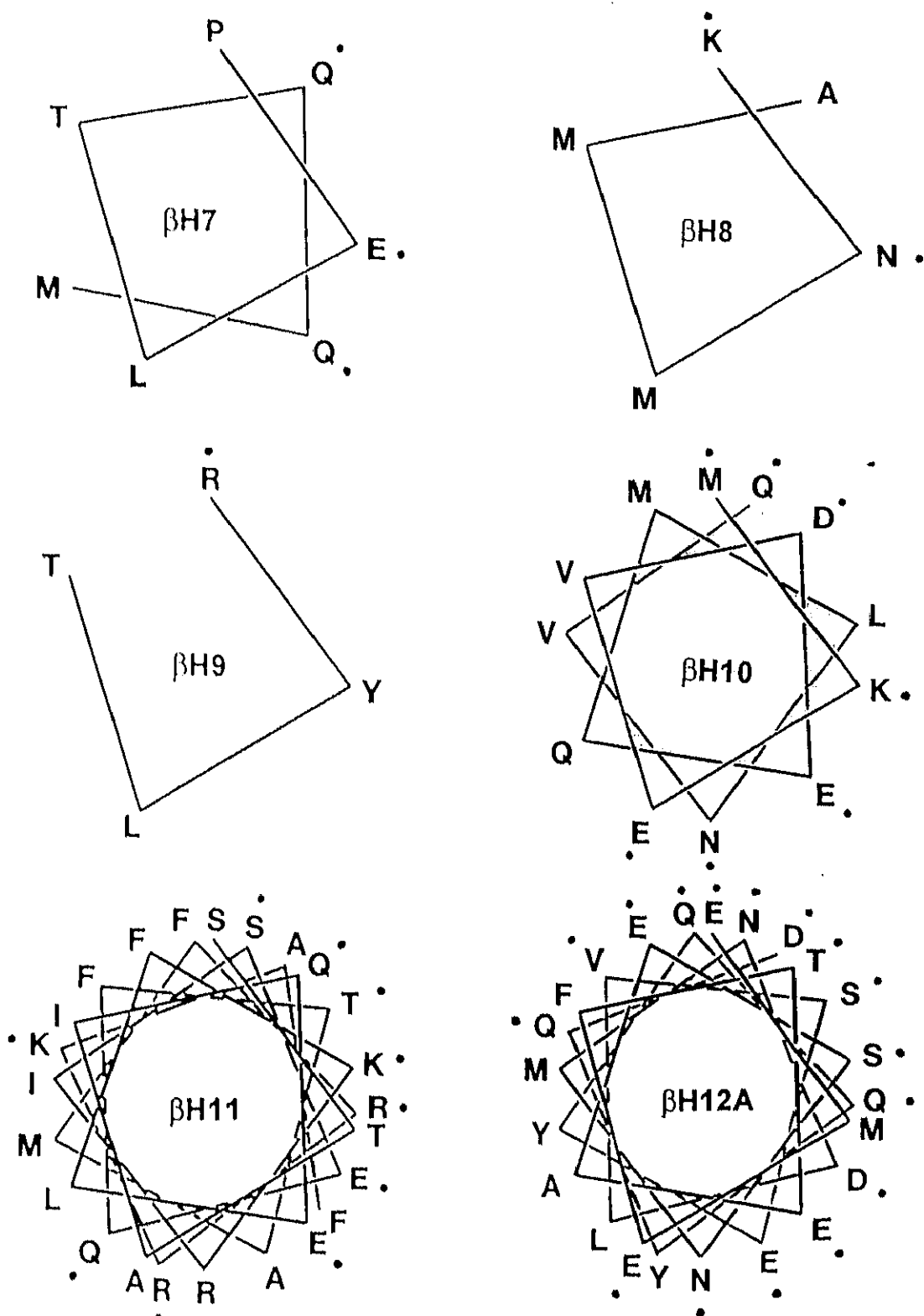


Figura 67 (continuación). Segmentos de β -tubulina para los que se predice estructura helicoidal (ver tabla 32). Se representan los residuos proyectados en el plano perpendicular al eje de la hélice. Los residuos se indican con el código de una letra; los puntos junto a ciertos residuos indican que están expuestos al solvente según la predicción de accesibilidad.

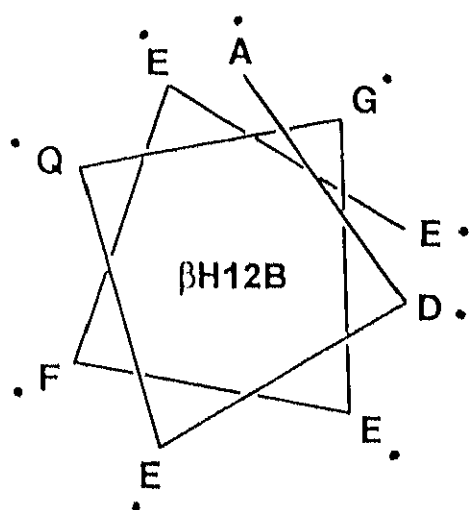


Figura 67 (continuación). Segmentos de β -tubulina para los que se predice estructura helicoidal (ver tabla 32). Se representan los residuos proyectados en el plano perpendicular al eje de la hélice. Los residuos se indican con el código de una letra; los puntos junto a ciertos residuos indican que están expuestos al solvente según la predicción de accesibilidad.

proteína, protegida del solvente.

Hélice β H5.

El momento hidrofóbico de esta hélice es intermedio, a diferencia de su equivalente α H5. La predicción de accesibilidad del solvente para los aminoácidos de la hélice β H5 es similar a los de β H4. Como aquella β H5 parece estar oculta al solvente en el interior de la proteína.

Hélice β H6.

Tiene muy bajos valores de momento hidrofóbico y no presenta una clara distribución asimétrica de la accesibilidad del solvente asignada a los residuos de esta hélice.

Hélice β H7.

Aunque decae al final el valor de momento hidrofóbico de esta pequeña hélice es elevado. Gráficamente se observa una región con predominio de residuos expuestos y otra ocluidos. Los valores de accesibilidad del solvente a los residuos ocluidos no son marcadamente bajos. Presenta carácter anfipático.

Hélices β H8 y β H9.

Son dos pequeñas hélices que apenas completan una vuelta. β H8 tiene 5 aminoácidos y β H9 tiene 4.

Hélice β H10.

Aunque el momento hidrofóbico para esta hélice no es elevado, se observan dos lados. Una cara poco accesible al solvente y otra cara, más extensa, rica en residuos cargados expuesta al solvente.

Hélice β H11.

Esta región tiene una marcada predicción de estructura secundaria de hélice. El momento hidrofóbico es elevado en una primera parte. Luego al igual que en su equivalente de la cadena α , α H10, aparece un valle marcado y termina en un máximo. Gráficamente se

observa una cierta asimetría en la distribución de los valores de la predicción de accesibilidad del solvente. La cara oculta al solvente está más definida que la expuesta. En ésta última se intercalan residuos ocultos.

Hélice β H12.

La hélice β H12 abarca una extensa región de 34 residuos cerca del extremo carboxilo. Se distinguen dos regiones y se subdivide en β H12A y β H12B.

β H12A se extiende desde la posición 405 a 429. Se caracteriza por una fuerte predicción de hélice. Hay un predominio del carácter expuesto de los residuos de esta región. En su parte central el momento hidrofóbico es elevado y los pocos residuos con baja accesibilidad se localizan espacialmente en un lado de la hélice dándole un carácter anfipático.

β H12B se extiende entre las posiciones 430 a 438 en la que predominan los residuos ácidos y polares. La probabilidad de adoptar estructura de hélice es menor que en β H12A. Todos los residuos tienen altos valores de accesibilidad al solvente y el momento hidrofóbico toma valores discretos en esta zona.

4. PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA DE FtsZ.

Para la predicción de estructura secundaria y accesibilidad de FtsZ por los métodos PHDsec y PHDacc, basados en el análisis de múltiples secuencias, se emplearon las secuencias de FtsZ de *Escherichia coli* (Yi y Lutkenhaus 1985), *Bacillus subtilis* (Beall, Lowe et al. 1988) y *Rhizobium meliloti* (Margolin, Corbo et al. 1991), únicas secuencias de esta proteína disponibles en la base de datos SWISSPROT (versión 31.0, febrero 1995). La homología entre FtsZ y tubulina oscila entre el 5-15% (tabla 33), y no se detectó ninguna otra proteína con un identidad de secuencia igual o superior al 30%, que es el nivel mínimo de similitud de secuencia suficiente para existir homología estructural en proteínas de más de 100 residuos (Sander y Schneider 1991). Por emplear un alineamiento múltiple con sólo 3 secuencias, la calidad de la predicción de la estructura secundaria y accesibilidad del solvente de FtsZ es inferior al óptimo previsto por los métodos PHDsec y PHDacc (ver materiales y métodos).

Tabla 33. Porcentajes de identidad de secuencia de proteínas FtsZ entre sí y con tubulinas.

		FtsZ			Tubulina		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>R. meliloti</i>	α	β	γ
FtsZ	<i>E. coli</i>	46%	42%		5-12 %	7-15%	8-10%
	<i>B. subtilis</i>		43%		6-11 %	8-14%	7-10%
	<i>R. meliloti</i>				5-10%	4-13%	8-10%

La predicción de estructura secundaria (figura 61) indica el siguiente contenido de cada una de las estructuras: 44.4% de hélice, 15.4% de lámina β y 40.2% de bucles. Proporcionalmente hay un mayor contenido de hélice que en las tubulinas, y una menor presencia de lámina β . En la tabla 34 se enumeran los elementos de estructura secundaria previstos.

Tabla 34. Elementos de estructura secundaria en FtsZ de *Escherichia coli*.

Elemento estructural	Nombre	Posición ^a	Longitud ^b (Å)
Bucle		1-12	
Lámina β	zE1	13-17	16.5
Bucle		18-22	
Hélice α	zH1	(23)24-33(34)	15.0(18.0)
Bucle		35-36	
Lámina β	zE2	(37)38-41(42)	13.2(19.8)
Bucle		43-45	
Hélice α	zH2	46-52(53)	10.5(12.0)
Bucle		54-55	
Lámina β	zE3	(56)58-60(61)	9.9(19.8)
Hélice α	zH3	(62)63-65(66)	4.5(7.5)
Bucle		67-74	
Hélice α	zH4	(75)78-92(93)	22.5(28.5)
Bucle		94-96	
Lámina β	zE4	97-102	19.8
Bucle		103-106	
Hélice α	zH5	(107)108-121(122)	19.5(24.0)
Bucle		123-125	
Lámina β	zE5	126-132	23.1
Bucle		133-139	
Hélice α	zH6	(140)142-156(159)	22.5(30.0)
Lámina β	zE6	(160)161-162	6.6(9.9)
Bucle		163-165	
Hélice α	zH7	(166)167-171(172)	7.5(10.5)
Bucle		173-177	
Hélice α	zH8	178-200(201)	34.5(36.0)
Bucle		202-211	
Hélice α	zH9	(212)213-223	16.5(18.0)
Bucle		224-232	
Hélice α	zH10	233-244	18.0
Bucle		245-249	
Hélice α	zH11	(250)251-252(257)	3.0(12.0)
Bucle		258	
Lámina β	zE7	(259)260-264(265)	16.5(23.1)
Bucle		266-272	
Hélice α	zH12	(273)274-285	18.0(19.5)
Bucle		286-290	
Lámina β	zE8	291-295	16.5
Bucle		296-299	
Hélice α	zH13	(300-302)	(4.5)
Bucle		303-304	
Lámina β	zE9	(305)306-312(313)	23.1(29.7)
Bucle		314-353	
Hélice α	zH14	(354-357)	(6.0)
Bucle		358-374	
Hélice α	zH15	375-379(380)	7.5(9.0)
Bucle		381-383	

^a Entre paréntesis se indican las posiciones en las que se extienden los elementos estructurales cuya predicción tiene un grado de confianza inferior al 82%.

^b Extensión de la región de los elementos estructurales cuya predicción tiene un grado de confianza superior al 82%. Entre paréntesis se indica la extensión total.

En la predicción de accesibilidad del solvente destaca la baja accesibilidad general, con presencia de grandes regiones con marcado carácter ocluido. Tan sólo en la región carboxilo terminal se observa un predominio de residuos potencialmente expuestos. Los bajos valores de accesibilidad al solvente pueden estar relacionados con una potencial interacción de FtsZ con la membrana plasmática en base a su función y localización durante la división bacteriana, si bien no se han descrito evidencias de esta interacción. En la secuencia de FtsZ no se observa ninguna región con estructura potencial de hélice transmembrana (resultados no presentados).

Las hélices α de FtsZ se caracterizan por el predominio del carácter ocluido de sus residuos, a excepción de zH4. El estudio del momento hidrofóbico calculado para un ángulo de ca. 100° indica la posibilidad de que al menos las hélices: zH1, zH6, zH8 y zH12, presenten características anfipáticas (figura 69). Complementariamente se analizó de modo gráfico la presencia de un patrón de repetición de la accesibilidad característico de estructuras anfipáticas (figura 70). En todas las hélices, a excepción de zH4, se observa en estas zonas un homogéneo carácter ocluido. En zH4 hay unos pocos residuos expuestos potencialmente al solvente, que se localizan en un mismo lado de la hélice, definen un pequeño lado hidrofílico y dan un carácter anfipático a la hélice.

5. COMPARACIÓN DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DE TUBULINA Y FtsZ.

Se alinearon simultáneamente las secuencias de FtsZ de *E. coli*, *B. subtilis*, *R. meliloti*, con las de α y β -tubulina de cerebro porcino y la γ -tubulina humana. Se utilizó el programa PILEUP empleando como valores de penalización de creación y extensión de huecos de 3.0 y 0.1 respectivamente. A partir del alineamiento de secuencias se compararon las predicciones de estructura secundaria y accesibilidad del solvente (figura 71).

La mayor región con homología de estructura secundaria comprende los segmentos 98-178 de β -tubulina y 66-140 de FtsZ. Los potenciales elementos de estructura secundaria de esta región son: un bucle, una hélice α potencialmente anfipática, un bucle, un segmento de lámina β ocluido, un bucle, una hélice α , un bucle, un segmento de lámina β y un bucle.

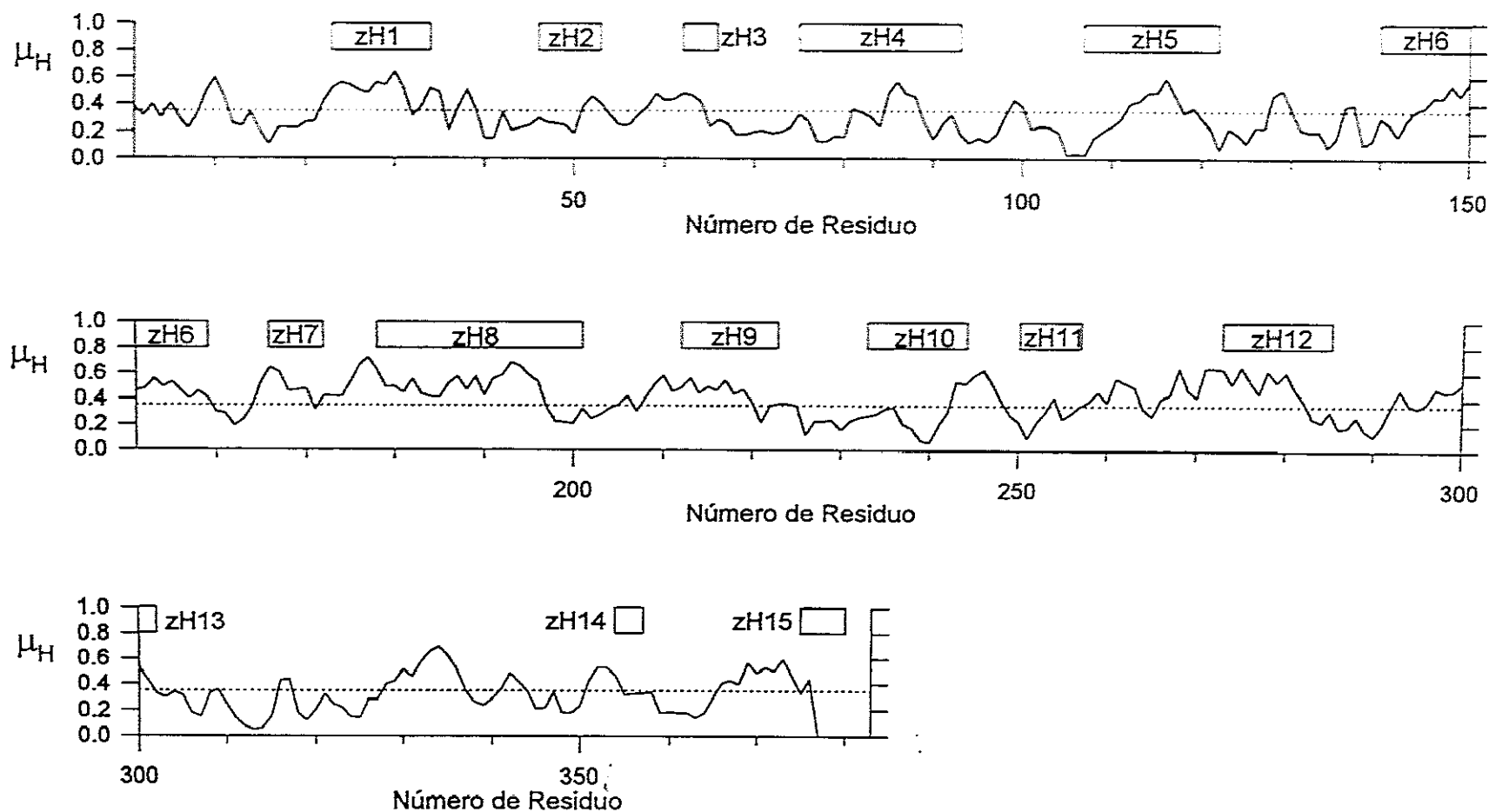


Figura 69. **Momento hidrofóbico (μ_H)** de la secuencia de FtsZ de *Escherichia coli*, calculado para un ángulo de rotación entre 95° y 105° correspondiente a una estructura de hélice α . Las cajas indican la posición de los elementos de hélice α predichos para esta secuencia. La línea de puntos indica el valor medio observado.

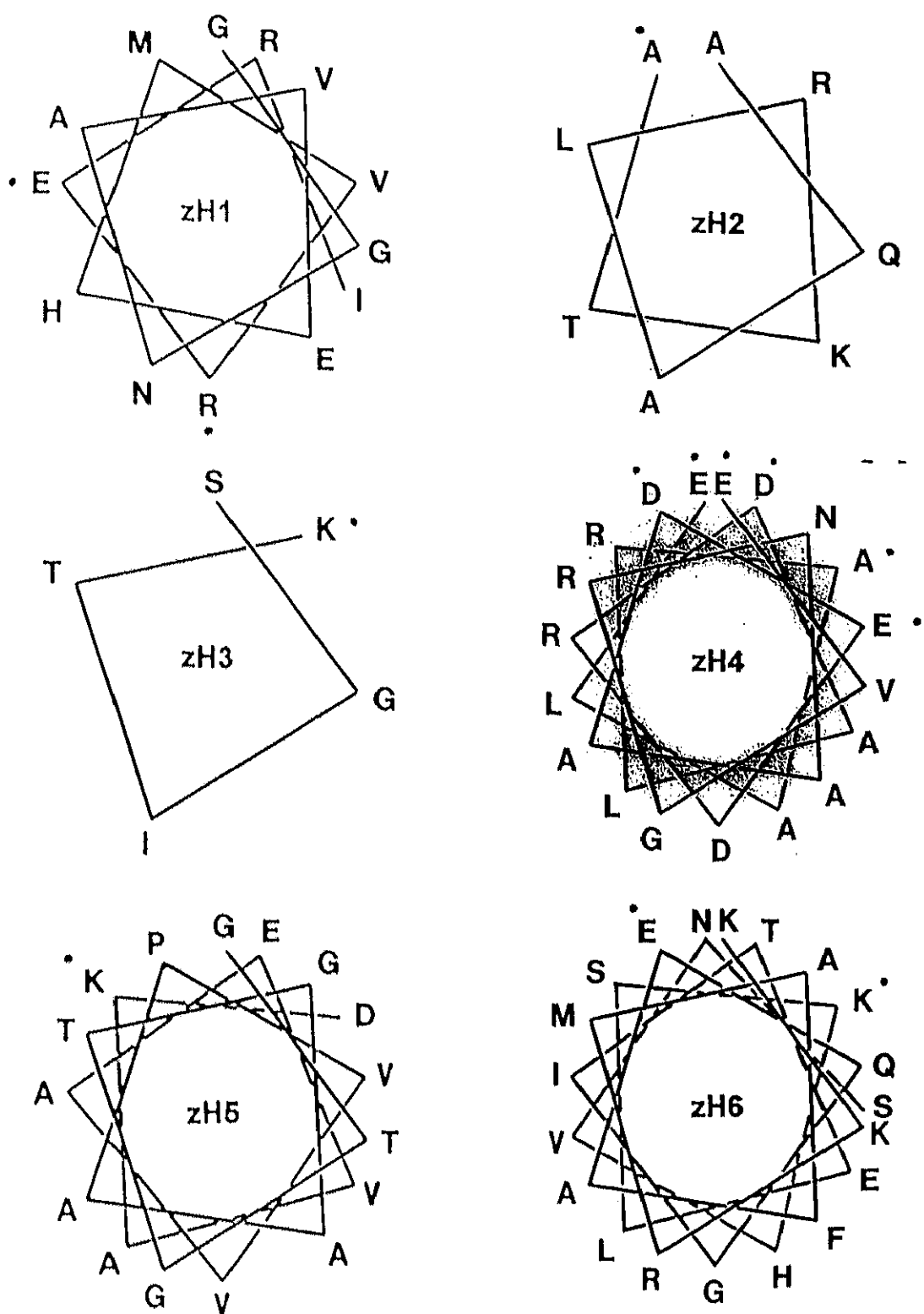


Figura 70. Segmentos de FtsZ para los que se predice estructura helicoidal (ver tabla 33). Se representan los residuos proyectados en el plano perpendicular al eje de la hélice. Los residuos se indican con el código de una letra; los puntos junto a ciertos residuos indican que están expuestos al solvente según la predicción de accesibilidad.

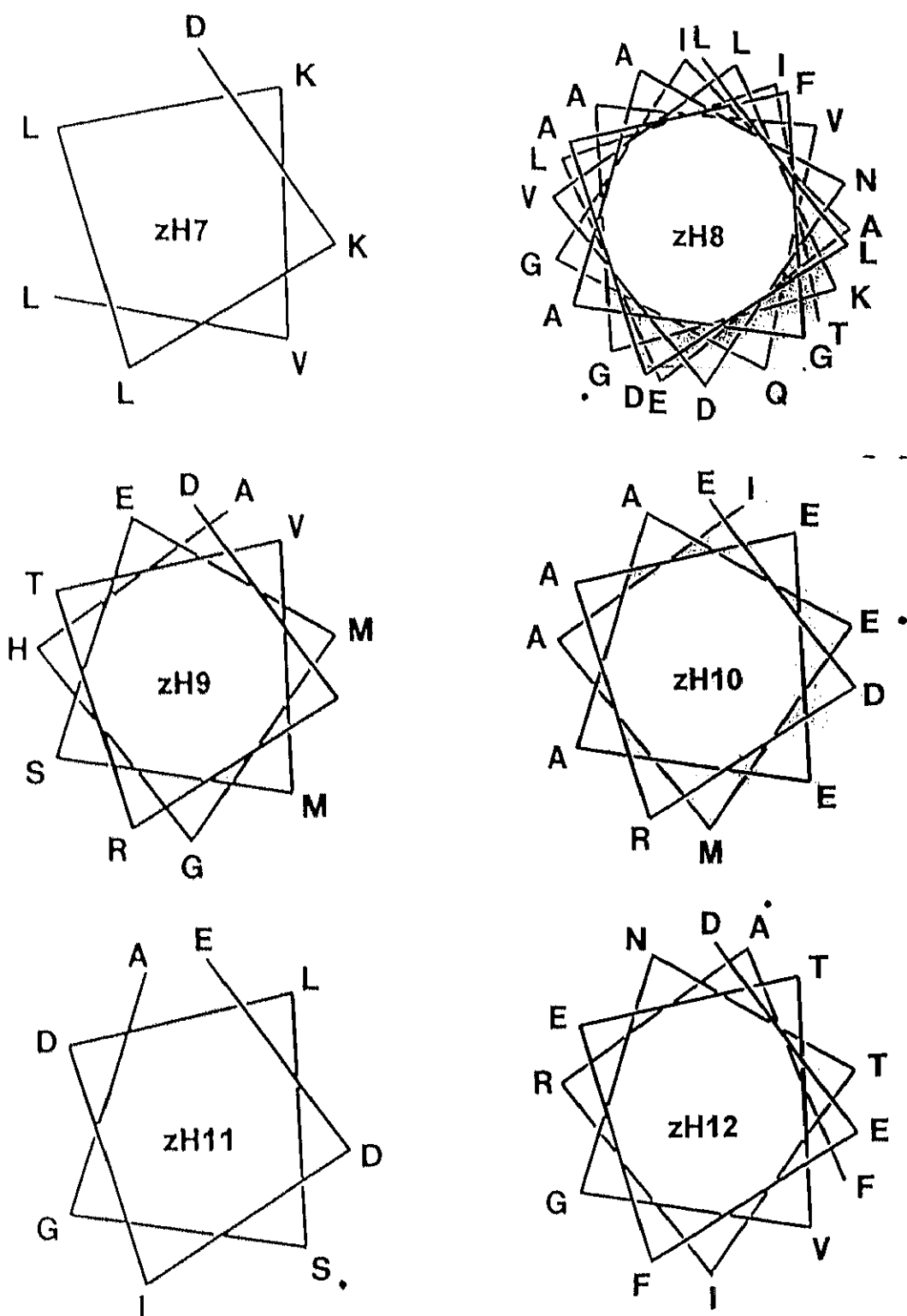


Figura 70 (continuación). Segmentos de FtsZ para los que se predice estructura helicoidal (ver tabla 33). Se representan los residuos proyectados en el plano perpendicular al eje de la hélice. Los residuos se indican con el código de una letra; los puntos junto a ciertos residuos indican que están expuestos al solvente según la predicción de accesibilidad.

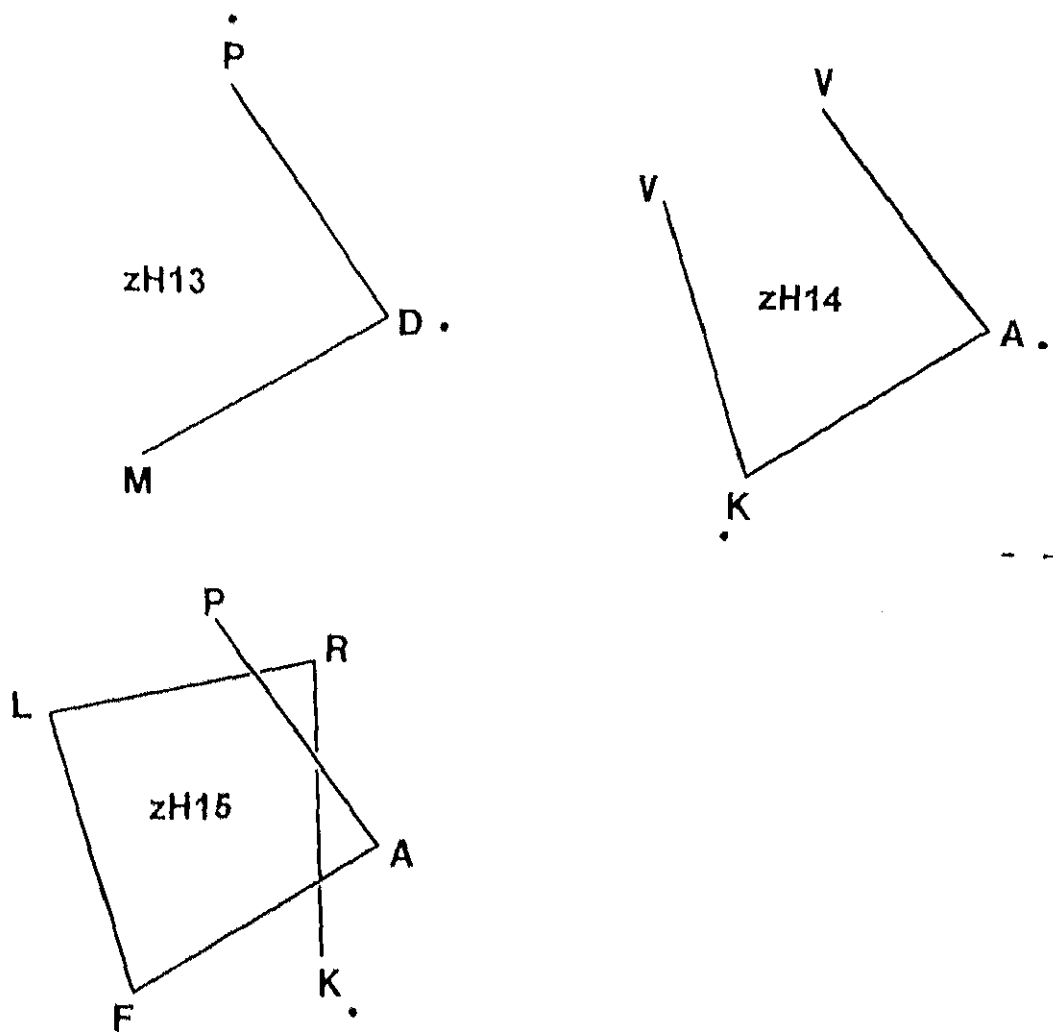


Figura 70 (continuación). Segmentos de FtsZ para los que se predice estructura helicoidal (ver tabla 33). Se representan los residuos proyectados en el plano perpendicular al eje de la hélice. Los residuos se indican con el código de una letra; los puntos junto a ciertos residuos indican que están expuestos al solvente según la predicción de accesibilidad.

En esta región con homología de estructura secundaria se localizan dos regiones con homología de secuencia con motivos de unión de nucleótido.

Al principio de estas regiones se localizan las secuencias supuestamente equivalentes, aunque invertidas, con el bucle de unión de fosfato en GTPasas. Aunque los motivos de ambas proteínas no se encuentran secuencialmente alineados, el entorno estructural es similar en ambos casos. Se localizan en bucles potencialmente ocluidos, anteriores a sendas hélices con carácter anfipático (β H2 y zH4).

La región rica en Gly característica de tubulinas β (140-146) y de FtsZ (105-112), se localiza en un bucle ocluido y se prolonga en una hélice (β H3 y zH5).

Tras este potencial bloque estructural no se observa ningún otro segmento significativo de alineamiento de estructura secundaria. Las terceras regiones con homología con motivos de unión de nucleótido presente en tubulinas, β -²²⁰PTYGD²²⁴, y FtsZ, ²⁰⁸VDFAD²¹², (ver introducción) no se aparean en el alineamiento múltiple de secuencias realizado. El análisis de la predicción de estructura secundaria de ambas proteínas en el entorno de estos motivos revela cierta homología estructural. En los dos casos estas regiones se localizan en la parte final de un bucle que une dos hélices potencialmente ocluidas: entre β H4 y β H5 en β -tubulina y entre zH8 y zH9 en FtsZ. Sin embargo hay discrepancias en la predicción de accesibilidad de estos bucles en β -tubulina y en FtsZ, expuesto y ocluido respectivamente.

Entre el primer bloque estructural y éste segundo motivo (hélice-bucle-hélice) se extienden regiones sin homología de estructura secundaria. En β -tubulina hay una región de ca. 25 residuos con bajo potencial de estructura secundaria en el que se predice la presencia de pequeños segmentos de lámina β . En FtsZ esta región de enlace es más extensa, ca. 40 residuos, y se predice la presencia de hélices.

A partir del residuo 235 de β -tubulina y del 224 de FtsZ no se detecta ninguna zona con homología de secuencia o estructura secundaria significativa.

Discusión

-
1. La proteólisis limitada facilita información estructural.
 - 1.1. Enlaces peptídicos hidrolizados.
 - 1.2. Interpretación de los puntos potenciales de proteólisis limitada que no son digeridos.
 2. Regiones definidas sensibles a proteólisis limitada en α y β -tubulina.
 3. Proteólisis limitada de microtúbulos inducidos por taxol.
 - 3.1. Consecuencias estructurales del ensamblaje.
 - 3.2. Zonas sensibles al ataque proteolítico en microtúbulos: topología de la superficie externa de los microtúbulos.
 4. Proteólisis limitada de tubulina en presencia de Zn^{2+} .
 - 4.1. Cambio conformacional inducido por Zn^{2+} .
 - 4.2. Proteólisis limitada de tubulina en presencia de Zn^{2+} .
 - 4.3. Efecto de la polimerización en hojas sobre la accesibilidad a proteasas.
 - 4.4. Proteólisis limitada de hojas inducidas por Zn^{2+} : comparación con los microtúbulos inducidos por taxol.
 5. Modelo de estructura de las regiones α (103-172) y β (93-170) de tubulina y (66-139) de FtsZ.
-

1. LA PROTEOLISIS LIMITADA FACILITA INFORMACIÓN ESTRUCTURAL

1.1. ENLACES PEPTÍDICOS HIDROLIZADOS.

La proteólisis limitada es una técnica clásica en el abordaje de la relación estructura-función de proteínas (por ejemplo (Wilson 1991; Plyte y Kneale 1994)). Se ha empleado extensamente para obtener información sobre la estructura terciaria, organización de complejos supramoleculares, cambios conformacionales, estados intermedios de plegamiento, etc. Los enzimas proteolíticos no digieren enlaces que no sean accesibles. Sin embargo aún en proteínas de pequeño tamaño esto implica que la digestión podría ocurrir en numerosos puntos de la secuencia. Pero la experiencia muestra que la digestión sólo se produce en unos pocos de los enlaces accesibles. Dos factores condicionan la localización de los sitios de ataque proteolítico.

Es obvio que la especificidad de la proteasa es un requisito que reduce el número de enlaces accesibles susceptibles de ser digeridos. Sin embargo la especificidad no es el principal determinante del ataque proteolítico. Por ejemplo la tripsina digiere en enlaces con residuos de Arg o Lys. Estos aminoácidos polares tienen propensión a localizarse expuestos al solvente, por lo tanto según la accesibilidad se esperaría la presencia de numerosos puntos de digestión controlada con tripsina, sin embargo típicamente se detecta un número muy limitado (e.g. este trabajo).

El segundo y principal factor que determina la sensibilidad de los puntos de corte engloba las características estructurales del entorno. La digestión limitada se produce en regiones accesibles con elevada movilidad. Existe una correlación entre posiciones de ataque proteolítico y flexibilidad, entendida esta última por ejemplo como la falta de estructura definida (e.g. (Fontana, Fassina et al. 1986)). En el reconocimiento de sustratos por serinas proteasas son necesarios grandes cambios conformacionales en los primeros a tres niveles: orientación de las cadenas laterales, modificaciones en los ángulos ϕ y ψ y movimientos relativos de elementos estructurales. Este reconocimiento, proteasa-sustrato, se ha explicado como un modelo de "ajuste inducido". La alteración radical de la conformación del sustrato así como los grandes movimientos relativos del mismo, necesarios frecuentemente para la

digestión, hacen que la proteólisis controlada se limite a regiones accesibles, flexibles y preferentemente proyectadas hacia el solvente (Hubbard, Campbell et al. 1991). Dentro de estos tipos de estructuras se incluyen las regiones "bisagra", bucles proyectados sobre la superficie o, de forma general, segmentos expuestos carentes de estructura secundaria definida.

Las regiones "puente" entre dominios estructurales son un ejemplo típico de regiones sensibles a la digestión. Esto ha llevado erróneamente a considerar los fragmentos producidos en la proteólisis limitada como dominios estructurales incluso en casos en los que los fragmentos no se separan. Es más correcto referirse a las regiones secuenciales de una proteína en las que no se localizan puntos de proteólisis limitada como "fragmentos proteolíticos". Por ejemplo la proteólisis limitada de G-actina con tripsina se produce en las posiciones 62-63 y 68-69, y con quimotripsina entre 67-68 (Jacobson y Rosenbusch 1976). Esta región sensible a la digestión se encuentra en el subdominio 2 de la estructura de la actina y no es una zona de enlace entre dominios o subdominios estructurales (Kabsch, Mannherz et al. 1990). Es un ejemplo en el que no hay correspondencia entre "fragmentos proteolíticos" y "dominios estructurales".

1.2. INTERPRETACIÓN DE LOS PUNTOS POTENCIALES DE PROTEOLISIS LIMITADA QUE NO SON DIGERIDOS.

Como se ha indicado anteriormente de los enlaces que satisfacen la especificidad de las proteasas, la proteólisis sólo se produce en aquellos que tienen una determinada flexibilidad y accesibilidad. Resta la interpretación de los puntos potenciales de corte en los que no se produce digestión enzimática.

¿Es correcto deducir que los puntos potenciales de corte no digeridos se localizan en regiones inaccesibles de la proteína?. La utilización de varias proteasas, que comparten parcial o totalmente la selectividad de sustrato, permite distinguir tres casos. La situación más general incluye los puntos potenciales de corte que no son digeridos por ninguna proteasa con esa especificidad. α y β -tubulina contienen respectivamente 24 y 21 residuos de Asp, fuera del extremo carboxilo. Fuera de esta zona sólo se han observado un posible

punto de proteolisis en un residuo de Asp producido por la proteasa V8 y ninguno por endoproteinasa Asp-N.

Un segundo grupo lo constituyen puntos potenciales de corte no digeridos pero que se localizan en regiones sensibles a proteolisis limitada, próximos a otros puntos de corte. Endoproteinasa Lys-C digiere el enlace K280-A281 de α -tubulina, sin embargo el punto adyacente Y282-H283 no es digerido por quimotripsina, a pesar de ser un punto de corte potencial de esta proteasa. Además quimotripsina sí digiere la β -tubulina entre Y281-R282, equivalente a Y282-H283 de la cadena α , no sensible.

El tercer grupo lo constituyen los puntos de corte que son digeridos por una determinada proteasa pero no por otra que comparte igual especificidad. Por ejemplo la endoproteinasa Lys-C digiere la α -tubulina en los puntos K40-T41 y K280-A281. Sin embargo estos dos puntos, potencialmente sensibles a tripsina, no son digeridos por esta proteasa.

En conclusión, sí se puede afirmar que los residuos de la proteína no accesibles están protegidos de la digestión. Pero no es correcto suponer que todos los posibles puntos de corte que no son sensibles a las proteasas se localicen en regiones inaccesibles de la proteína.

2. REGIONES DEFINIDAS SENSIBLES A PROTEOLISIS LIMITADA EN α Y β -TUBULINA.

Los puntos de proteolisis limitada de la tubulina no se distribuyen homogéneamente a lo largo de ambas secuencias. Al contrario, la digestión se concentra en zonas definidas y delimitadas, como se muestra en las figuras 72 y 73. La utilización de una amplia gama de proteasas, con diferentes especificidades, refuerza el significado estructural de estas regiones. La acumulación de los puntos de corte en regiones definidas no se debe a la concentración de un cierto tipo de puntos sensibles, sino a las características estructurales de las zonas en que se producen. La proteolisis limitada se produce preferentemente en zonas de la proteína flexibles y accesibles. Con anterioridad se han descrito tres zonas sensibles a proteasas en α y β -tubulina (de la Viña, Andreu et al. 1988). En el presente trabajo se han definido con mayor precisión estas y otras zonas gracias a un análisis exhaustivo de los productos de la

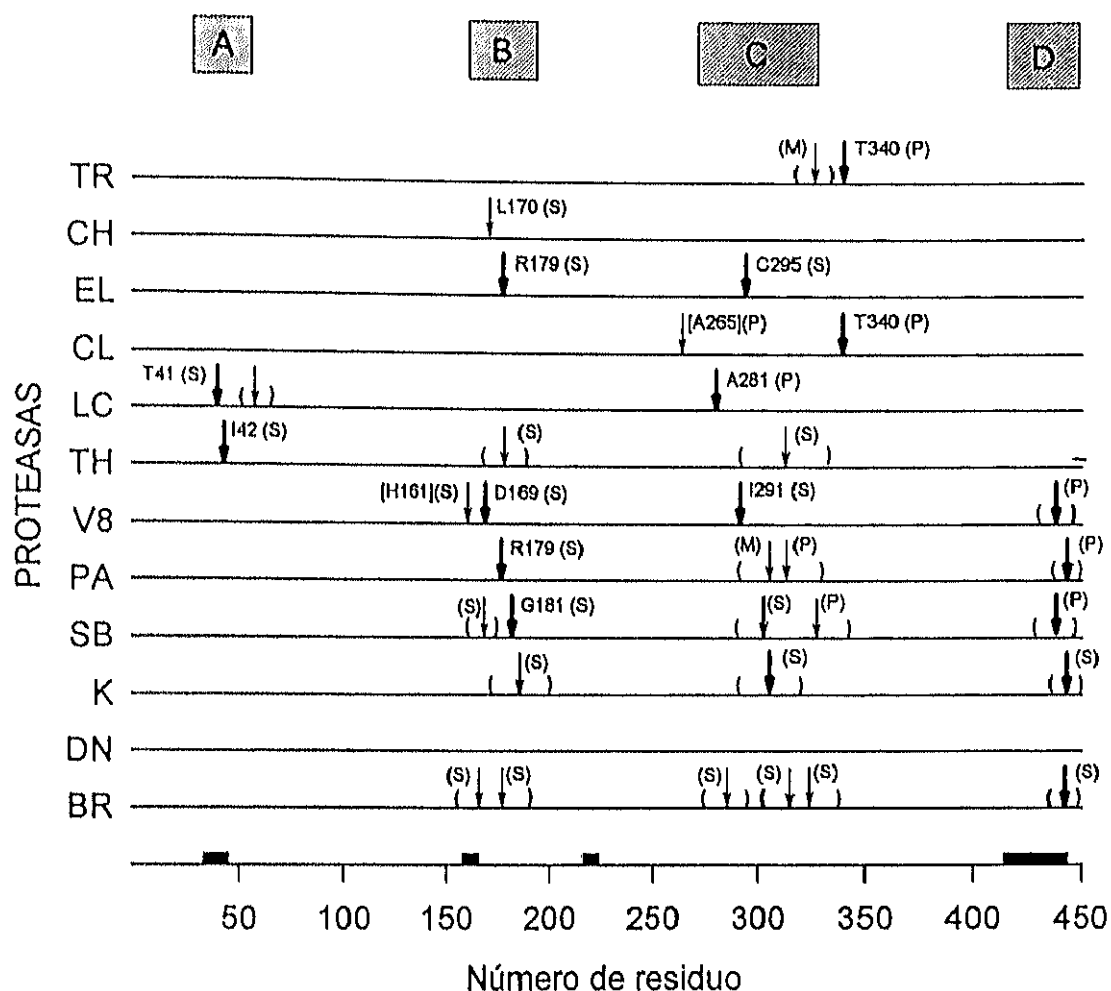


Figura 72. Mapa de proteólisis limitada de α -tubulina por 12 proteasas. Cualitativamente se distinguen dos tipos de puntos de corte: en trazo grueso se indican los cortes mayoritarios y en trazo fino los minoritarios. Los números junto a las flechas indican la posición del primer residuo tras el corte, se indican entre corchetes las posiciones asignadas putativamente. Junto a cada flecha se indica entre paréntesis si el punto de corte es sensible en la tubulina polimerizada en microtúbulos inducidos por taxol (s), si se protege en el polímero (p) o si sólo se observa en la digestión de la forma polimerizada (M). Los paréntesis a los lados de las flechas representan la zona de incertidumbre en la ubicación de los puntos de corte. Se han localizado a partir del peso molecular aparente corregido y la reactividad con los anticuerpos monoespecíficos indicados como rectángulos negros en la parte inferior. Los rectángulos en la parte superior (A, B, C y D) marcan la extensión aproximada de las regiones sensibles en proteólisis limitada.

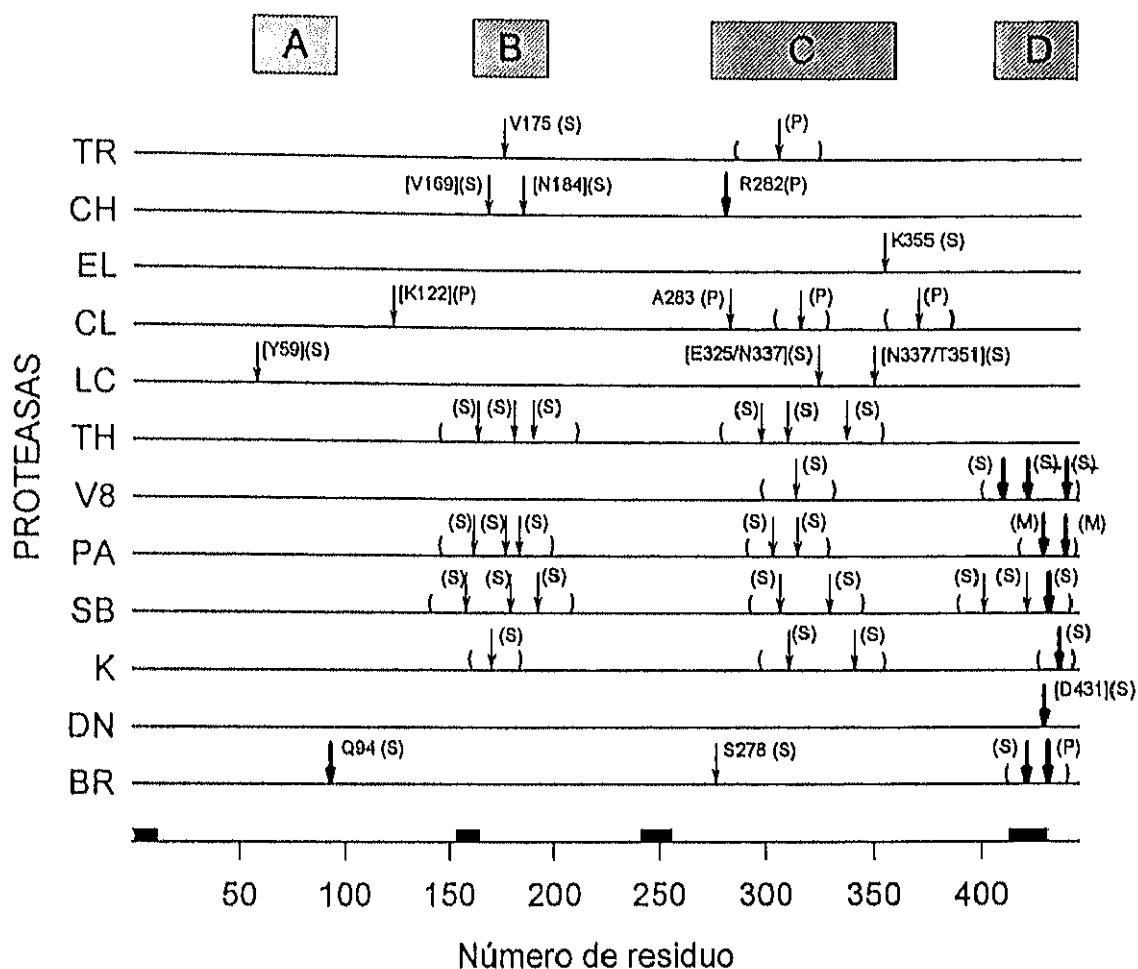


Figura 73. Mapa de proteólisis limitada de β -tubulina por 12 proteasas. Cualitativamente se distinguen dos tipos de puntos de corte: en trazo grueso se indican los cortes mayoritarios y en trazo fino los minoritarios. Los números junto a las flechas indican la posición del primer residuo tras el corte, se indican entre corchetes las posiciones asignadas putativamente. Junto a cada flecha se indica entre paréntesis si el punto de corte es sensible en la tubulina polimerizada en microtúbulos inducidos por taxol (s), si se protege en el polímero (p) o si sólo se observa en la digestión de la forma polimerizada (M). Se han localizado a partir del peso molecular aparente corregido y la reactividad con los anticuerpos mono-específicos indicados como rectángulos negros en la parte inferior. Los rectángulos en la parte superior (A, B, C y D) marcan la extensión aproximada de las regiones sensibles en proteólisis limitada.

digestión. Se ha determinado la localización exacta de 18 puntos de corte mediante secuenciación N-terminal de 25 fragmentos. Los fragmentos de tubulina así identificados se han empleado posteriormente como un conjunto nuevo y completo de estándares internos de peso molecular en la determinación realista de los pesos moleculares aparentes de los 94 fragmentos no secuenciados y que no son complementarios de otros identificados. Esta determinación precisa del tamaño aparente de los productos de la digestión, combinada con el análisis de la reactividad frente a un extenso panel de anticuerpos con especificidad de secuencia, ha contribuido a la mejor definición de las regiones de ataque proteolítico preferencial. Se ha observado la presencia de una cuarta región sensible a la proteólisis limitada, no descrita con anterioridad, presente en ambas cadenas. Las regiones se denominan A, B, C y D, en orden de localización a lo largo de las secuencias.

La región A es la que contiene el menor número de puntos de corte. A diferencia de las otras regiones, su localización puede ser distinta en α y β -tubulina (figura 74). En la cadena α esta región se extiende desde la posición 40 hasta aproximadamente la 61. El grupo ϵ -amino de la Lys40 de la cadena α es un punto de acetilación post-traducciona. Este residuo se localiza en la superficie de la proteína, es accesible a la tubulina acetil transferasa así como a anticuerpos específicos de esta modificación (Greer, Maruta et al. 1985; LeDizet y Piperno 1991). La predicción de estructura secundaria indica un alto potencial de bucle y una elevada accesibilidad del solvente para la región 26-47 de α -tubulina. El tercer punto de corte en esta región se localiza presumiblemente entre las posiciones 60-61, en una región con predicción de bucle expuesto. La región 65-97 de la secuencia de α -tubulina en el estado no ensamblado es reconocida por el anticuerpo monoclonal TU-01 (Grim, Breitling et al. 1987; Dráber, Dráberová et al. 1989). Los dos bucles potenciales en los que se produce la digestión se encuentran a ambos lados del segmento con predicción de lámina β , α E2.

En la cadena β esta región está definida por tan sólo dos puntos de corte entre las posiciones 58-59 y 93-94. La ausencia de puntos de proteólisis en β -tubulina en las posiciones equivalentes a la región A de la cadena α puede deberse simplemente a las diferencias de secuencia entre ambas cadenas. Por ejemplo en la región 27-45, con predicción de bucle expuesto no existe ningún punto potencialmente sensible a endoproteinasa Lys-C. Sin embargo la localización superficial de esta región está apoyada experimentalmente por

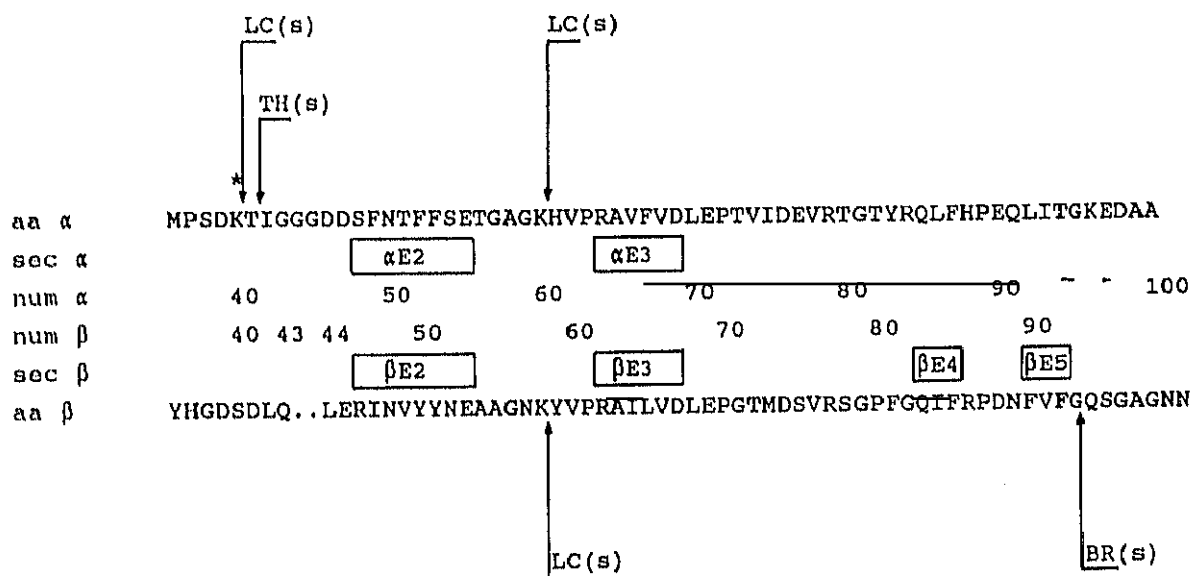


Figura 74. Región A de α - y β -tubulina sensible a proteólisis limitada. (aa α/β) regiones 36-100 de α - y β -tubulina de cerebro porcino. (sec α/β) elementos de estructura secundaria asignados según el método PHDsec. (num α/β) numeración de los residuos. Las flechas indican los puntos de digestión controlada. (s) puntos de digestión sensibles en la proteína ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol. (*) residuo Lys40 de acetilación post-traducciona.

la accesibilidad de la región $\beta(28-38)$ a anticuerpos específicos en la proteína nativa heterodimérica (Chène, Mazarguil et al. 1992). Tras el extremo carboxilo, esta es la región de la secuencia de tubulina con mayor variabilidad, que contiene secuencias características de isotipos (Sullivan y Cleveland 1986).

La región B se localiza sobre y en las posiciones inmediatamente posteriores a los epítomos $\alpha(155-168)$ y $\beta(153-165)$, que están expuestos en la proteína nativa (Arévalo, Nieto et al. 1990). Se extiende aproximadamente en las mismas posiciones de α y β -tubulina, entre los residuos 160 y 190 (figura 75). La mayor parte de los puntos de corte se localizan en regiones con predicción de estructura de bucle y en menor medida sobre los segmentos de lámina β , $\alpha E5$ y $\beta E7$, equivalentes en ambas cadenas. La accesibilidad de las regiones B apoya la hipótesis de que los segmentos con predicción de hélice, $\alpha H3$ y $\beta H3$, que contienen el final de la región rica en Gly, están orientados con el extremo amino hacia el interior de la proteína, posiblemente participando en el sitio de unión de nucleotido, y el carboxilo hacia la superficie (figura 83). En el factor de elongación Tu, la secuencia correspondiente al motivo GxxxxGK(S/T) que interacciona con los fosfatos del nucleotido unido, enlaza un segmento de lámina β con una hélice que se dirige del bolsillo de unión del nucleotido hacia la superficie, dando paso a una región accesible al solvente (la Cour, Nyborg et al. 1985; Kjeldgaard, Nissen et al. 1993). Un anticuerpo monoespecífico frente a la secuencia de tubulina $\beta(154-165)$, próxima a la región B, inhibe el intercambio de nucleotido y el ensamblaje (Hesse, Thierauf et al. 1987).

La región C contiene el mayor número de puntos de corte y se extiende a lo largo del segmento de mayor tamaño. Su localización es aproximadamente igual en α y β -tubulina. Aproximadamente comprende las regiones 260-340 y 275-360 de α y β respectivamente. Los puntos de corte de esta región identificados con exactitud se concentran en dos subregiones definidas, C_A y C_B (figura 76).

En la cadena α se localizan 3 puntos de corte definidos en la región 280-295, que definen la subregión C_A . Tripsina y clostripaina digieren entre las posiciones 339-340 de α -tubulina, en torno a este punto de corte se localiza la subregión C_B . La predicción de estructura secundaria para la subregión C_A de α -tubulina comprende parte del bucle que

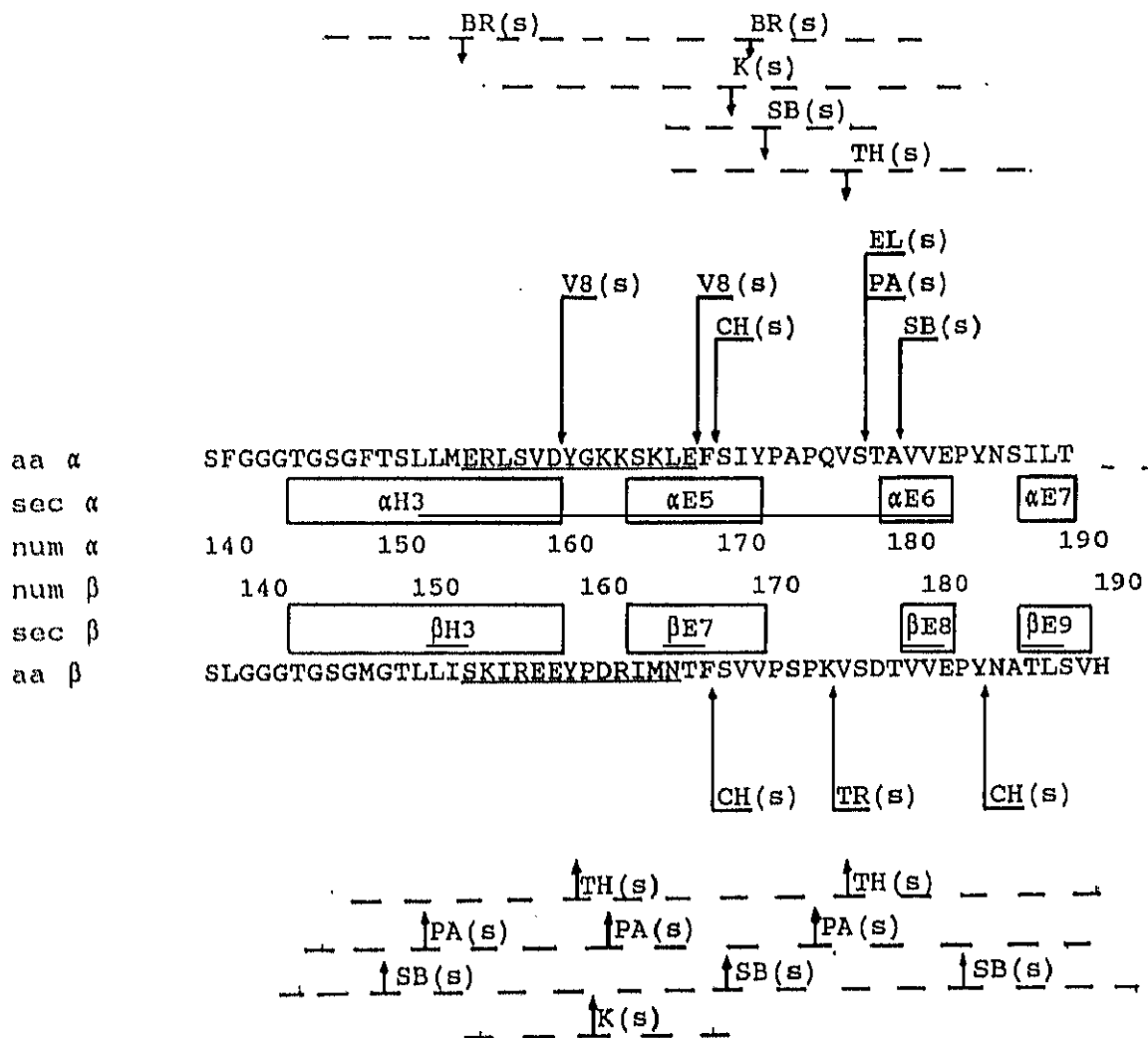


Figura 75. Región B de α - y β -tubulina sensible a proteólisis limitada. (aa α/β) regiones 140-190 y 138-190 de α - y β -tubulina de cerebro porcino respectivamente. (sec α/β) elementos de estructura secundaria asignados según el método PHDsec. (num α/β) numeración de los residuos. Se han subrayado las secuencias correspondientes a los epítomos α (155-168) y β (153-165). Las flechas indican los puntos de digestión controlada. Las líneas discontinuas son las zonas de probable localización de los puntos de corte a que acompañan. (s) puntos de digestión sensibles en la proteína ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol.

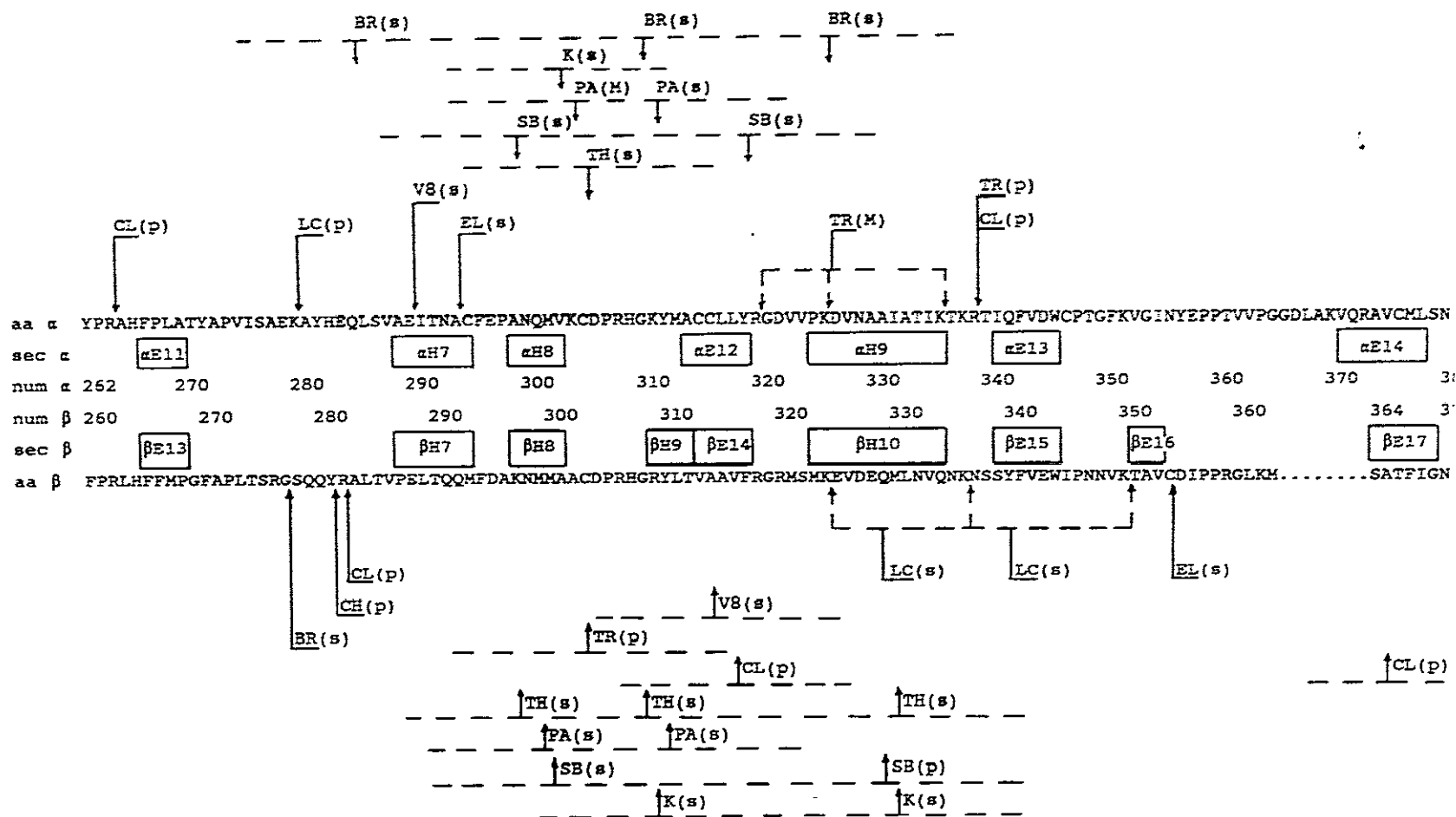


Figura 76. Región C de α - y β -tubulina sensible a proteólisis limitada. (aa α/β) regiones 262-380 y 260-370 de α - y β -tubulina de cerebro porcino respectivamente. (sec α/β) elementos de estructura secundaria asignados según el método PHDsec. (num α/β) numeración de los residuos. Cada abreviatura de una proteasa corresponde a un punto de corte, las flechas indican su localización. Las líneas discontinuas son las zonas de probable localización de los puntos de corte a que acompañan. (s) puntos de digestión sensibles en la proteína dimerica y ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol. (p) puntos de digestión protegidos en la forma polimerizada. (M) puntos de digestión observados solamente en la forma ensamblada.

enlaza el segmento de lámina β , $\alpha E11$ con la hélice anfipática $\alpha H7$. El bucle presenta dos regiones con predicción de accesibilidad del solvente marcada y diferente, hasta la posición 277 predomina el carácter ocluido, a partir de esta posición la accesibilidad asignada es elevada. El punto de corte se localiza en la fracción potencialmente accesible del bucle. Los dos puntos de corte, 290-291 y 294-295, localizados en la hélice $\alpha H7$, están espacialmente orientados hacia el mismo lado de la hélice. En la figura 77 se ilustra la posible estructura secundaria de la subregión C_A . La subregión C_B se localiza aproximadamente entre las posiciones 337-340, para las que se predice una estructura de bucle con altos valores de accesibilidad del solvente, en concordancia con los resultados experimentales. Este bucle une la hélice $\alpha H9$, con carácter anfipático y predominio de la superficie expuesta al solvente, con el segmento de lámina β , $\alpha E13$.

En la cadena β la subregión C_A se extiende aproximadamente entre las posiciones 275 y 283. Para esta subregión se predice una estructura secundaria flexible y elevada accesibilidad del solvente. Al igual que ocurre en α -tubulina, tras este bucle aparece una potencial hélice α , $\beta H7$, con carácter anfipático. A diferencia de la cadena α , no se han localizado puntos de proteólisis limitada en este hipotético elemento estructural. Por similitud de secuencia y potencial de estructura secundaria y accesibilidad, se supone que esta subregión adopta una estructura espacial similar en ambas proteínas (figura 77). La subregión C_B de β -tubulina se localiza en las inmediaciones del punto de corte 354-355 producido por elastasa. Esta región presenta bajo potencial de estructura secundaria. La sensibilidad a las proteasas sugiere que el pequeño segmento de lámina β , $\beta E16$, en cuyas proximidades se produce la digestión con elastasa, puede ser en realidad una región con escasa rigidez estructural.

El resto de los puntos de corte de la región C de α y β -tubulina se han ubicado aproximadamente, a partir del peso molecular aparente corregido de los fragmentos que producen, entre ambas subregiones. Es posible que estos puntos se localicen concentrados en torno a las dos subregiones.

La región carboxilo terminal es sensible al ataque de diversas proteasas y constituye la región D (figura 78). Se extiende aproximadamente por los 20 últimos residuos de α -tubulina y los 50 últimos residuos de β -tubulina. El número de puntos de proteólisis limitada

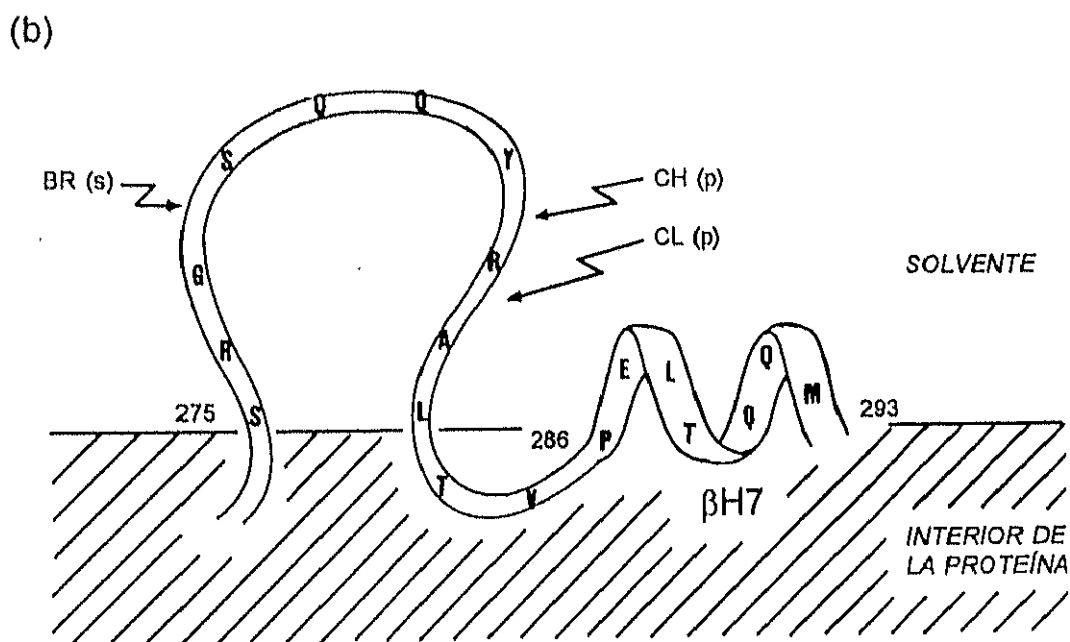
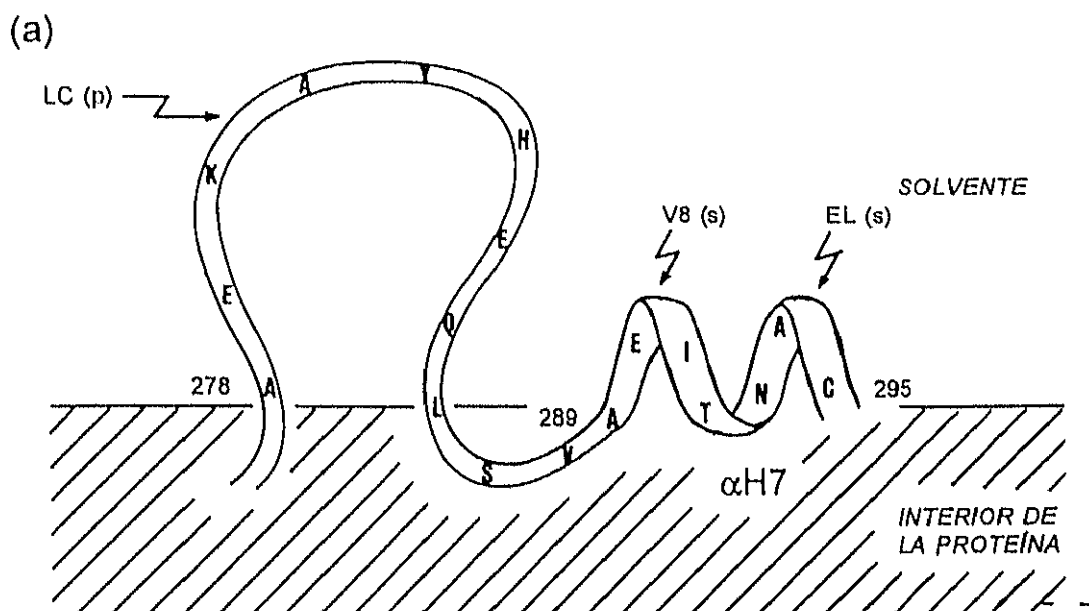


Figura 77. Representación esquemática de una posible estructura de las regiones 278-295 de α -tubulina (a) y 275-293 de β -tubulina (b). Estas secuencias forman parte de las subregiones de ataque proteolítico preferente C_A en ambas proteínas. Las flechas indican los puntos de digestión y junto a ellas se indica la proteasa que los digiere; entre paréntesis se indica si el punto es sensible en la proteína ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol (s) o si se protege en la forma polimerizada (p). La representación se ha efectuado sobre un plano exclusivamente con el fin de dar claridad a la ilustración, y no presupone que esta sea la orientación espacial de los dos elementos: bucle y hélice- α .

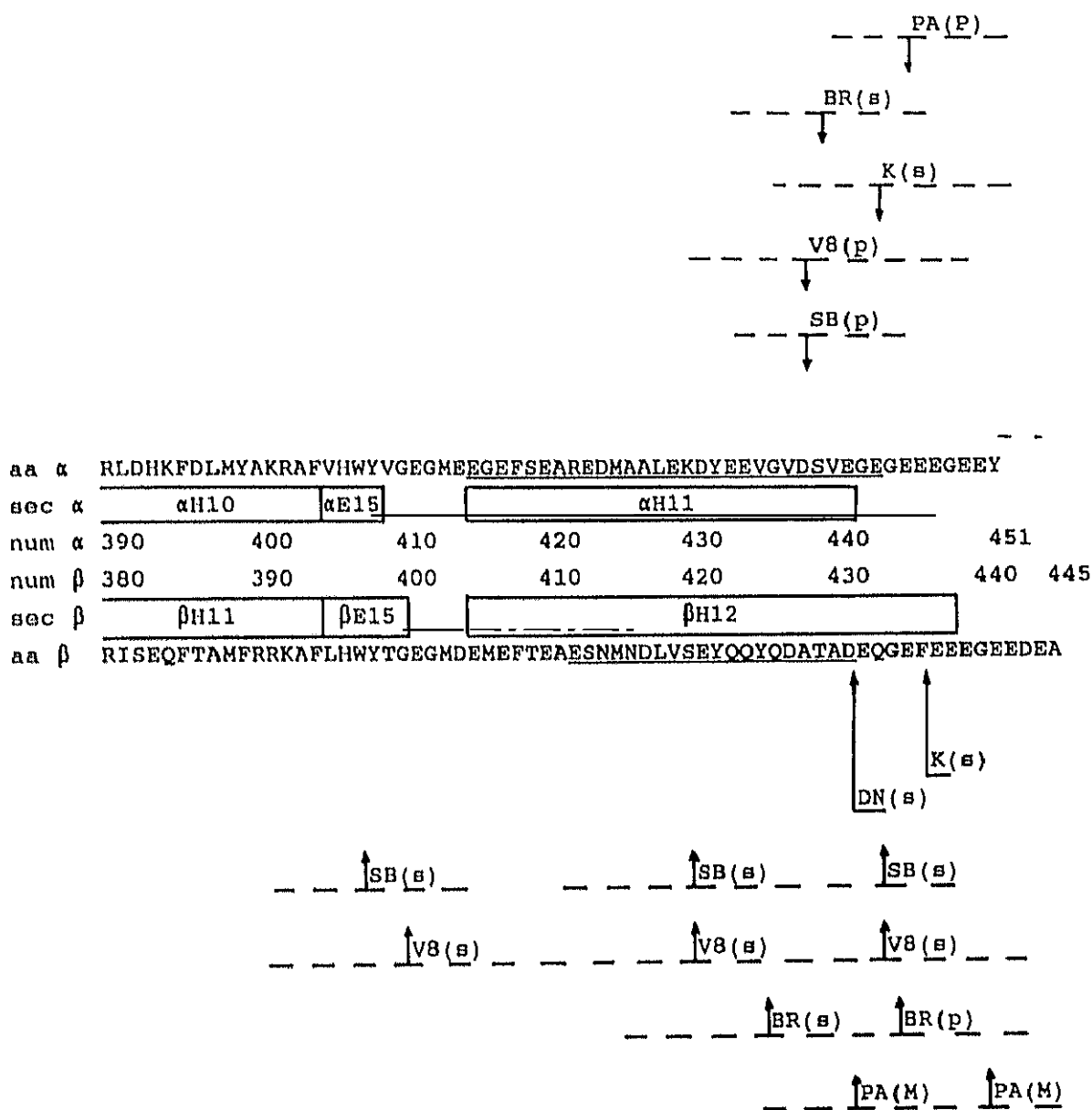


Figura 78. Región D de α - y β -tubulina sensible a proteólisis limitada. (aa α/β) regiones 390-451 y 380-445 de α - y β -tubulina de cerebro porcino respectivamente. (sec α/β) elementos de estructura secundaria asignados según el método PHDsec. (num α/β) numeración de los residuos. Se han subrayado las secuencias correspondientes a los epítopos α (415-443) y β (412-431). Cada abreviatura de una proteasa corresponde a un punto de corte, las flechas indican su localización mas probable. Las líneas discontinuas son las zonas de probable localización de los puntos de corte a que acompañan. (s) puntos de digestión sensibles en la proteína ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol. (p) puntos de digestión protegidos en la forma polimerizada. (M) puntos de digestión observados solamente en la forma ensamblada.

es mayor en la región D de la cadena β , 10 puntos, que en la cadena α , 4 puntos. De lo anterior se deduce una diferencia de sensibilidad entre los extremos carboxilo de ambas proteínas, tanto en extensión de la región como en su susceptibilidad al ataque proteolítico. Con anterioridad se ha descrito que la subtilisina digiere la subunidad β en el extremo carboxilo con una velocidad 3 a 4 veces superior que la subunidad α (Bhattacharyya, Sackett et al. 1985; Sackett y Wolff 1986; Paschal, Obar et al. 1989; Melki, Kerjan et al. 1991; Redeker, Melki et al. 1992).

Está comúnmente aceptado que los extremos carboxilo de α y β -tubulina son regiones altamente flexibles y expuestas al solvente. Son regiones implicadas en las interacciones con MAPs y motores microtubulares, y son accesibles a enzimas implicadas en la modificación post-traducciona de tubulinas, que se producen mayoritariamente en esta región. Epítomos localizados cerca de los extremos carboxilo son reconocidos por anticuerpos específicos en la tubulina heterodimérica y en formas polimerizadas de la misma (Breitling y Little 1986; de la Viña, Andreu et al. 1988; Arévalo, Nieto et al. 1990; de Inés 1995). Se ha propuesto que la accesibilidad de los extremos carboxilo se debe a ser regiones que estructuralmente se proyectan sobre la superficie de la proteína hacia el solvente (Sackett y Wolff 1986), si bien la extensión de esta afirmación debe ser matizada.

La predicción de estructura secundaria indica la presencia de sendas hélices, α H11 y β H12, en el extremo carboxilo de las dos cadenas. Tras las hélices se extienden dos pequeñas regiones terminales con bajo potencial de estructura secundaria, de 10 y 7 residuos en la α y la β -tubulina respectivamente. El estudio por dicroísmo circular de la estructura secundaria de péptidos de expresión y de síntesis correspondientes a las regiones carboxilo terminal indica una baja contribución de estructura α -hélice en tampón acuoso neutro, pero confirma un elevado potencial de estructura α -hélice (Reed, Hull et al. 1992; Evangelio 1995).

Los puntos de ataque proteolítico en la cadena α se localizan en la porción final de la hélice α H11, en la cual el potencial helicoidal decae. La ausencia de cortes en posiciones de la secuencia más internas confirma la rigidez estructural de la región con predicción de estructura helicoidal, a pesar de predominar el carácter expuesto al solvente de sus residuos.

En β -tubulina la digestión se produce mayoritariamente en el final de la hélice potencial β H12, con elevada predicción de accesibilidad del solvente. Dos puntos de corte,

producidos por subtilisina y la proteasa V8 respectivamente, se localizan en el interior de la hélice β H12. La presencia de cortes en el interior del segmento β H12 puede indicar que no se trata de una única hélice de gran tamaño, con una longitud total entre 3.5 y 5.0 nm, sino de al menos dos hélices unidas por un pequeño bucle sensible a la proteólisis. Otros dos puntos producidos por las mismas proteasas se localizan en torno a la posición 400, en el bucle que precede a la hélice o sobre el segmento de lámina extendida β E15.

El estudio de la accesibilidad del solvente indica un predominio del carácter expuesto en las regiones de las hélices α H11 y β H12. Así mismo se aprecia un carácter anfipático en aproximadamente los dos primeros tercios de ambas hélices, con un lado minoritario de la hélice con residuos ocluidos. En consecuencia las hélices podrían interaccionar con el resto de la proteína a través de la pequeña cara ocluida, y no estarían totalmente proyectadas fuera de la misma hacia el solvente. Esta interacción explicaría la estabilización de la estructura de α -hélico, a penas observada en los fragmentos en solución (Reed, Hull et al. 1992; Evangelio 1995). Al menos hasta las posiciones α 435 y β 430, las regiones carboxilo están significativamente estructuradas. Las posibles regiones con alta movilidad y proyectadas hacia el solvente se limitarían a aproximadamente los últimos 15 residuos de ambas cadenas.

3. PROTEOLISIS LIMITADA DE MICROTÚBULOS INDUCIDOS POR TAXOL

3.1. CONSECUENCIAS ESTRUCTURALES DEL ENSAMBLAJE.

En el ensamblaje de tubulina en microtúbulos inducidos por taxol hay 3 causas potenciales de modificación de la accesibilidad en las moléculas de tubulina: la oclusión de superficies debida a contactos intermoleculares, cambios en la estructura consecuentes al ensamblaje y el efecto directo de la unión del ligando.

Una diferencia substancial entre la tubulina heterodimérica y ensamblada en microtúbulos es la extensión de la superficie de la proteína accesible al solvente y a sondas como anticuerpos y proteasas. El ensamblaje de los microtúbulos conlleva la oclusión de 3 tipos de áreas, relacionada cada una con una hipotética etapa de ensamblaje: formación de

protofilamentos, agregación lateral de los mismos y cierre de la estructura cilíndrica.

En las interacciones a lo largo de un mismo protofilamento se ocluyen la regiones implicadas en los contactos longitudinales entre heterodímeros. Por analogía se puede establecer que la región de α -tubulina implicada en estas interacciones longitudinales es equivalente a la región de β -tubulina implicada en los contactos entre monómeros de tubulina en el heterodímero $\alpha\beta$ y viceversa (Arévalo, Nieto et al. 1990).

En las interacciones entre protofilamentos se ocluyen dos caras de la molécula de tubulina. En el modelo de estructura de microtúbulos inducidos por taxol en solución, el contacto entre moléculas de protofilamentos adyacentes no es uniforme. Existen dos cavidades en la densidad electrónica entre protofilamentos, una desde la luz del microtúbulo y otra más profunda desde el exterior, que originan el contraste entre protofilamentos (Andreu, Bordas et al. 1992). Sin embargo a efectos de accesibilidad de las proteasas, debido al impedimento estérico las superficies de interacción lateral se pueden considerar como ocluidas (figura 79).

La tercera superficie de la molécula de tubulina cuya accesibilidad se ve afectada por el ensamblaje es la orientada hacia la luz del microtúbulo. La accesibilidad de una determinada sonda a esta superficie está condicionada por su capacidad de difundir por el lumen, y ésta es función de las dimensiones de la sonda. En el estudio de accesibilidad de anticuerpos monoespecíficos a la tubulina ensamblada en microtúbulos se supuso que el lumen no es accesible. La difusión de las moléculas de inmunoglobulina-G, cada uno de cuyos fragmentos Fab tiene aproximadamente igual masa que los monómeros de tubulina, en el lumen estaría impedida estéricamente (Arévalo, Nieto et al. 1990).

Con el fin de determinar la accesibilidad de las proteasas empleadas al interior de los microtúbulos se puede estimar la dimensión aproximada de las proteasas, suponiendo simplemente simetría esférica. El radio de la esfera equivalente hidratada (R_H) tiene en cuenta las moléculas de agua unidas a la proteína. Suponiendo simetría esférica el valor de R_H , en cm, es función de la masa molecular (M) (Tanford 1963):

$$R_H = \left(\frac{3M}{4\pi N_0} (\bar{v}_P + \delta_s \bar{v}_S) \right)^{1/3}$$

Donde N_0 es el número de Avogadro, 6.02×10^{23} . \bar{v}_P es el volumen específico parcial de la proteína, se puede asignar un valor promedio de $0.73 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. δ_s es el grado de hidratación, se puede tomar como valor común para la mayoría de proteínas $0.35 \text{ g H}_2\text{O}$ por g proteína. \bar{v}_S es el inverso de la densidad del agua. Se ha calculado el radio de hidratación de las dos proteasas de mayor y menor masa molecular (tabla 35).

Tabla 35. Radios de stokes y de hidratación calculados para papaína y termolisina.

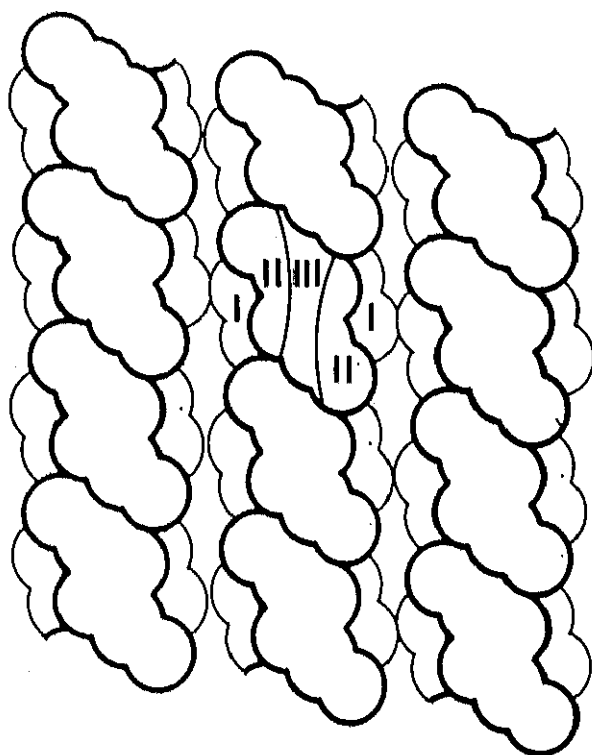
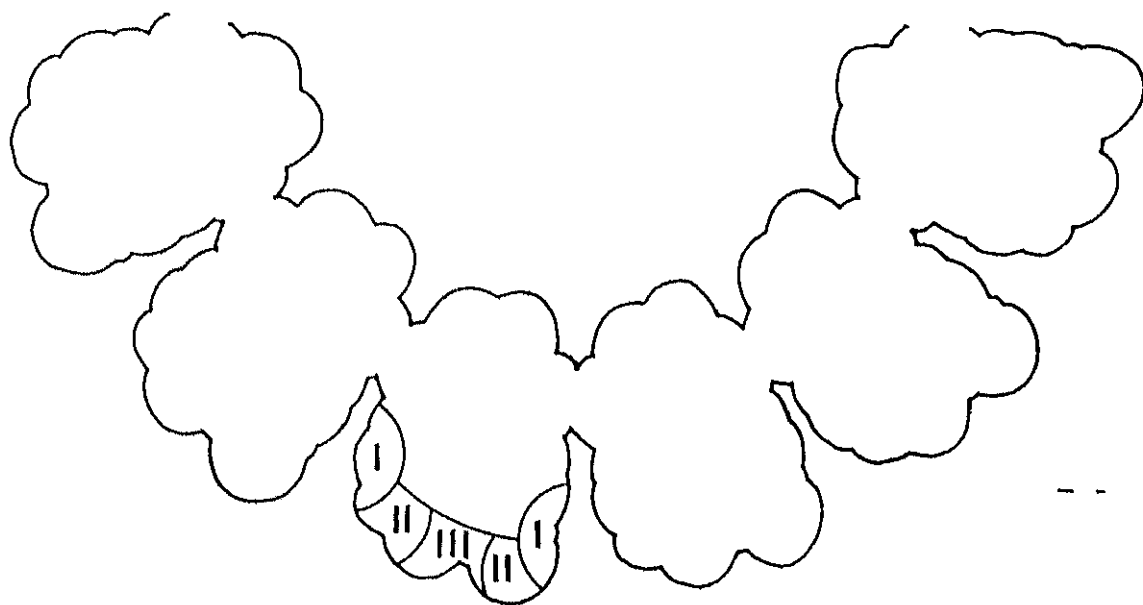
Proteasa	Peso Molecular (kD)	Radio de hidratación (nm)
Papaína	23.0	2.14
Termolisina	37.5	2.52

Siendo el radio interior (R_{int}) de los microtúbulos inducidos por taxol ca. 7 nm, debido al impedimento estérico las proteasas podrán ocupar un cilindro cuyo radio (R_{dif}) es la diferencia entre el radio del lumen y el radio de la proteasa (R_H):

$$R_{dif} = R_{int} - R_H$$

Según los R_H calculados (tabla 35), el R_{dif} varía entre 4.5 y 4.9 nm. Como se observa estas dimensiones son del mismo orden del propio tamaño de las partículas que se supone han de difundir por él. De forma cualitativa podemos suponer que la difusión de las proteasas en la luz del microtúbulo está impedida. En resumen hemos supuesto que la superficie de la tubulina orientada hacia el interior de los microtúbulos no se ve sometida a la acción de las proteasas, o si a caso lo está en mucha menor medida que la superficie externa.

Figura 79. Representación esquemática de las regiones de tubulina accesibles y ocluidas en el modelo propuesto por Andreu y col. (1992) de los microtúbulos inducidos por taxol en solución, a partir de datos de dispersión de rayos-X. (a) Contorno de la estructura de la mitad de un microtúbulo en sección transversal en la que se distinguen 6 monómeros. A la resolución del modelo no se aprecian diferencias estructurales entre los monómeros de α - y β -tubulina. En la representación se ha supuesto que todos los monómeros se sitúan en el mismo plano como simplificación gráfica, y su utilización se limita a ilustrar las posibles áreas de localización de los residuos según la accesibilidad de las sondas a los mismos. El tamaño de la circunferencia que se muestra junto a la cavidad externa entre protofilamentos corresponde al tamaño (hidratado) equivalente de una proteína con el peso molecular de la papaína (la menor de las proteasas utilizadas); da una idea de la superficie del microtúbulo explorada por las proteasas. Se distinguen 3 tipos de áreas: las zonas I indican una posible localización de las regiones que participan de los contactos laterales entre protofilamentos y se encuentran próximas a la superficie del microtúbulo, definida esta última por la accesibilidad de las sondas. Las zonas II comprenden la superficie accesible próximas a las anteriores de contactos laterales. La zona III es la superficie externa central. (b) Contorno de 3 protofilamentos adyacentes de la pared de un microtúbulo, visualizados desde el exterior y desarrollados sobre el plano, se muestran 12 monómeros de tubulina α o β . En esta representación no se presupone un tipo de hélice A o B. Las áreas I, II y III corresponden a las indicadas en la parte superior de la figura. La barra representa 4 nm.



Un segundo efecto posible debido al ensamblaje es la modificación estructural de la proteína. La elasticidad de las cadenas polipeptídicas apunta a su modificación como consecuencia de interacciones intramoleculares. El sistema de actina es un ejemplo de cambio conformacional ligado a la polimerización. Holmes y col. han propuesto un modelo de F-actina obtenido a partir del refinamiento del modelo de G-actina unida a DNAsa I, resuelto por el mismo grupo. Entre otras modificaciones, en F-actina se observa una reorganización de la zona de unión a DNAsa I en el subdominio 2 y del bucle 262-274 respecto al modelo de G-actina. Se ha propuesto que ambas zonas participan en contactos intramoleculares (Kabsch, Mannherz et al. 1990; Lorenz, Popp et al. 1993). La alteración conformacional puede producir tanto protección de puntos de corte por oclusión, estabilización o aumento de la rigidez, como exposición de nuevos puntos de ataque proteolítico. Se puede suponer simplícidamente que los cambios estructurales afectan con mayor probabilidad a las regiones implicadas en los contactos intermoleculares, y que se extienden menos a otras partes de la molécula.

El estudio de la estructura secundaria de tubulina mediante espectroscopía Raman indica la existencia de una diferencia conformacional entre la forma heterodimérica y ensamblada en microtúbulos, siendo la estructura de esta última muy parecida a la de tubulina con GDP en el sitio de nucleótido intercambiable (tubulina-GDP) (Audenaert, Heremans et al. 1989). Los patrones de proteólisis limitada de tubulina-GDP son similares a los observados para la forma GTP (datos no presentados). Suponiendo que la estructura de la forma tubulin-GDP no ensamblada es equivalente a la de la tubulina ensamblada en microtúbulos, mayoritariamente constituido por tubulina-GDP, podemos deducir que las diferencias de sensibilidad a proteasas no se deben a este presunto cambio estructural.

Un tercer proceso que puede afectar a la accesibilidad de las proteasas es la unión del ligando por sí mismo y no por la polimerización que induce. A su vez se pueden diferenciar 2 efectos derivados de la unión del taxol. Por un lado el ligando podría obstaculizar la acción de las proteasas por impedimento estérico. Por otro lado la unión del taxol podría fijar una conformación, reduciendo su flexibilidad y la consiguiente sensibilidad al ataque de las proteasas.

3.2. ZONAS SENSIBLES AL ATAQUE PROTEOLÍTICO EN MICROTÚBULOS: TOPOLOGÍA DE LA SUPERFICIE EXTERNA DE LOS MICROTÚBULOS.

Los puntos de digestión controlada de α - y β -tubulina heterodiméricas localizados en las regiones A y B, son igualmente sensibles al ataque proteolítico en la proteína ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol.

La localización del punto de digestión de α -tubulina K40-T41, y su adyacente T41-I42, está de acuerdo con la acetilación de la tubulina ensamblada en el residuo α Lys40, y la unión a microtúbulos de anticuerpos específicos de esta modificación post-traducciona (Greer, Maruta et al. 1985; LeDizet y Piperno 1991).

Anticuerpos específicos frente a la región α (155-168) no se fijan a microtúbulos ensamblados *in vitro* ni a microtúbulos celulares, en cambio anticuerpos frente a la región homóloga β (153-165) sí está expuestos en los polímeros (Arévalo, Nieto et al. 1990). Estos epítopos se localizan adyacentes a las regiones proteolíticas B. Contrasta la accesibilidad de los puntos de proteólisis limitada de la región B de la α -tubulina, con la oclusión del epítipo α (155-168) en la forma ensamblada. Esta diferencia puede deberse al distinto tamaño de la sonda. El fragmento Fab de los anticuerpos tiene un peso molecular próximo a 50 kDa mientras que las proteasas empleadas oscilan entre 23 y 37.5 kDa de peso molecular. Se ha propuesto que el tamaño de las inmunoglobulinas impide su acceso a las cavidades de la superficie de los microtúbulos (Arévalo, Nieto et al. 1990). El menor tamaño molecular de las proteasas permitiría una mayor penetración de estas sondas en dichas cavidades. Hemos supuesto que la superficie de la tubulina ensamblada explorada por las proteasas es mayor que la accesible a las inmunoglobulinas. En el modelo de la estructura en solución de los microtúbulos inducidos por taxol, las cavidades de la superficie microtubular se localizan entre las subunidades de tubulina (Andreu, Bordas et al. 1992). En consecuencia el epítipo α (155-168) se sitúa en las inmediaciones de los contactos entre protofilamentos, pero no está totalmente ocluido por las interacciones laterales. Por analogía el epítipo β (153-165) se localiza espacialmente en una región equivalente da la subunidad β . Sin embargo bien por estar más accesible o por ser distinta la naturaleza del anticuerpo ensayado, este epítipo es reconocido en los microtúbulos celulares y ensamblados *in vitro* (Arévalo, Nieto et al. 1990).

Mayoritariamente los puntos de corte de la región C de α - y β -tubulina son sensibles

a la proteólisis en los microtúbulos, y en consecuencia esta región se extiende principalmente por la superficie de la proteína expuesta en la pared externa de los microtúbulos. Sin embargo en esta región también se localizan todos los puntos de corte que se protegen con el ensamblaje. Los 5 puntos protegidos se agrupan en dos regiones definidas y de extensión limitada. En la subregión C_A el enlace K280-A281 de la cadena α , y los enlaces Y281-R282 y R282-A283 de β están protegidos en los microtúbulos. Estos residuos se localizan en una región con predicción de estructura de bucle, en concreto en una segunda mitad con predicción de elevado nivel de exposición al solvente. La zona protegida del ataque proteolítico está muy limitada secuencialmente. Hacia el extremo amino, en la cadena β el enlace G277-S278 es digerido por la bromelaína en la forma ensamblada. Hacia el extremo carboxilo, en la cadena α los puntos de corte E290-I291 y A294-C295, situados en una hélice potencial anfipática, son procesados en el polímero. La región del bucle que se ocluye durante la polimerización está proyectada dentro de una de las zonas de contactos laterales entre protofilamentos. Las regiones que las flanquean se localizan en la superficie de los monómeros expuestos al solvente. Se puede descartar la participación de este bucle en los contactos longitudinales dentro de un mismo protofilamento, ya que la protección se produce de forma equivalente entre las dos cadenas, α y β . Si participaran en los contactos longitudinales sólo se ocluiría la región de una de las cadenas, ya que por homología estructural y de orientación del monómero la otra región participaría en los contactos que se establecen entre dos monómeros de un mismo heterodímero. El otro punto de corte interno protegido se localiza en la región C_B de la cadena α , entre los residuos R339-T340. En la β -tubulina el enlace K336-N337 es un posible punto de proteólisis por endoproteinasa Lys-C, si bien su asignación no es inequívoca (ver resultados). En la digestión con tripsina de α -tubulina ensamblada además de protegerse el enlace R339-T340, aparece un nuevo punto de corte minoritario, probablemente localizado entre K326-D327 o K336-T337. La oclusión de un punto de corte y la aparición de otro, cercano aunque minoritario, descarta que la protección se produzca por localización del enlace α R339-T340 en el lumen del microtúbulo o en zonas muy profundas de su pared. En esta región se localiza la hélice potencial $\alpha H9$, con una longitud máxima aproximada de 1.8 nm. Se sitúa en una de las zonas de contacto longitudinal o lateral, en la cuarta parte más externa de estas áreas.

El efecto del ensamblaje sobre la sensibilidad proteolítica de las regiones carboxilo terminal es diferente en α - y β -tubulina. En la cadena α la región D se extiende en los últimos 15 a 20 aminoácidos de la proteína (ver antes). De los 5 puntos de ataque observados, como consecuencia del ensamblaje se protegen 3 y otros 2 continúan accesibles a las proteasas. Se observa cierta correlación entre la protección a la digestión y la localización propuesta de 2 de estos puntos, al final de la α -hélice α H11. Por el contrario los 2 puntos de digestión no alterados por el ensamblaje se localizan en la cola carboxilo terminal, de aproximadamente 10 residuos de extensión, con predicción de estructura secundaria desordenada y altamente expuesta al solvente, presuntamente proyectada fuera de la superficie de la proteína.

La región D de la β -tubulina se extiende hasta posiciones más internas que la de la cadena α (ver antes). Al contrario de la zona carboxilo terminal de la cadena α , en la forma ensamblada aumenta la sensibilidad del extremo carboxilo de β -tubulina. Sólo se observa un único punto de proteólisis (producido por bromelaína) aparentemente protegido durante la polimerización. Realmente no se puede asegurar que la disminución de los fragmentos debidos a este corte, observada en la digestión de la forma polimerizada (ver resultados), se deba exclusivamente a una protección de este enlace. Se podría explicar por un aumento de la sensibilidad del punto de corte que esta misma proteasa produce en una posición más interna. La digestión controlada con papaína presenta un comportamiento característico sobre la forma polimerizada; se detecta la presencia de al menos 2 puntos de digestión en la región D de la β -tubulina, no observados al digerir la proteína heterodimérica. Se concluye que la región carboxilo terminal de la β -tubulina no sólo mantiene su sensibilidad al ataque proteolítico al polimerizar en microtúbulos inducidos por taxol, sino que además es más sensible a dicha digestión. Este resultado es coincidente con el aumento de la sensibilidad a subtilisina de al menos un sitio de digestión en el extremo carboxilo de β -tubulina polimerizada (Lobert y Correia 1992), y con el aumento en la diferencia de sensibilidad a subtilisina del extremo carboxilo de las cadenas α y β , favoreciendo la proteólisis de la β frente a la α , cuando la tubulina está ensamblada en microtúbulos (Melki, Kerjan et al. 1991).

La localización probable en los microtúbulos de los residuos de la superficie de la tubulina se resume en las tablas 36a y 36b.

Tabla 36a. Localización de residuos superficiales de α -tubulina en los microtúbulos.

Residuos	Accesibilidad ^a	Localización probable en los microtúbulos
K40, T41, I42	E	Cara externa.
K59, H60	E	Cara externa.
D160, Y161	E	Cara externa, posiblemente adyacentes a la zona de contacto lateral.
E168, F169 S170	E	Cara externa, posiblemente adyacentes a la zona de contacto lateral.
S178, T179 A180, V181	E	Cara externa, posiblemente adyacentes a la zona de contacto lateral.
K280, A281	O	Zona de contacto entre protofilamentos, adyacente a la cara externa.
E290, I291 A293, C294	E	Cara externa, posiblemente adyacente a la zona de contacto lateral.
R339, T340	O	Ocluido, en la fracción más externa de la pared del microtúbulo.

^a Se han definido dos tipos de residuos según la sensibilidad de los enlaces en que participan: expuestos (E) si un enlace en el que intervienen es sensible en los microtúbulos y ocluido (O) si está protegido.

Tabla 36b. Localización de residuos superficiales de β -tubulina en los microtúbulos.

Residuos	Accesibilidad ^a	Localización probable en los microtúbulos
K58, Y59	E	Cara externa.
G93, Q94	E	Cara externa.
F167, S168	E	Cara externa.
K174, V175	E	Cara externa.
Y183, N184	E	Cara externa.
G277, S278	E	Cara externa, adyacente a la zona de contacto lateral.
Y281, R282, A283	O	Zona de contacto entre protofilamentos, adyacente a la cara externa.
C355, D356	E	Cara externa.

^a Se han definido dos tipos de residuos según la sensibilidad de los enlaces en que participan: expuestos (E) si un enlace en el que intervienen es sensible en los microtúbulos y ocluido (O) si está protegido.

4. PROTEOLISIS LIMITADA DE TUBULINA EN PRESENCIA DE Zn^{2+} .

4.1. CAMBIO CONFORMACIONAL INDUCIDO POR Zn^{2+} .

El espectro de dicroísmo circular, en el ultravioleta lejano, de tubulina en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM GTP, 0.3 mM $ZnCl_2$, pH 6.5, es significativamente diferente del observado en tampón fosfato neutro. Se ha interpretado que este efecto es consecuencia de un cambio en la estructura secundaria promedio de la tubulina.

En ausencia de Zn^{2+} , en tampón con 100 mM MES y 3.4 M glicerol, no se observa este cambio. En presencia de Zn^{2+} sí se observa una dependencia del efecto en la presencia de glicerol y la concentración de MES, siendo la modificación apreciable por encima de 40 mM MES.

Melki y Carlier (Melki y Carlier 1993) han estudiado el equilibrio de unión de Zn^{2+} a tubulina en unas condiciones similares a las empleadas en este trabajo: tampón 100 mM MES, 30% glicerol, pH 6.8, con una concentración de GTP variable entre 5 y 15 μM , y ausencia de Mg^{2+} , si bien la concentración residual de Mg^{2+} no se especifica en dicho trabajo. Han propuesto un modelo de unión a tubulina dimérica con 2 sitios de alta afinidad y 12 sitios de baja afinidad, con constantes de disociación a 4° C $K_{D,1}=5 \mu M$ y $K_{D,2}=400 \mu M$, respectivamente. Empleando estos valores de las constantes de disociación para la unión de Zn^{2+} a tubulina y la constante de disociación de la unión del Zn^{2+} a GTP de 11 μM (Sigel 1977; Correia, Baty et al. 1987), se ha calculado la relación entre la concentración de Zn^{2+} libre y total según la siguiente ecuación:

$$[Zn]_0 = [Zn] + [GTP]_0 \left(\frac{1}{1 + \frac{K_D}{[Zn]}} \right) + [TB]_0 \left(\frac{2}{1 + \frac{K_{D,1}}{[Zn]}} + \frac{12}{1 + \frac{K_{D,2}}{[Zn]}} \right)$$

En este modelo no se considera del Mg^{2+} presente, que por su potencial unión al MES, la tubulina y el GTP podría afectar significativamente los equilibrios de unión del Zn^{2+} con éstos dos últimos. La unión al MES es despreciable en estas condiciones ya que la

constante de disociación de este equilibrio es ca. 158 mM (Good, Winget et al. 1966). A la concentración de Mg^{2+} total determinada, ca. 144 μM , la tubulina une aproximadamente 2 moles de Mg^{2+} por mol de heterodímero $\alpha\beta$, correspondiente a los sitios de alta afinidad (G. Rivas comunicación personal). Como la concentración de proteína es 20 μM , estarán unidos ca. 40 μM de Mg^{2+} . El Zn^{2+} no desplaza al Mg^{2+} unido a los sitios de alta afinidad (Eagle, Zombola et al. 1983). Por último queda estimar el efecto de la unión del Mg^{2+} al GTP sobre la unión del Zn^{2+} al nucleótido. El Mg^{2+} se une al GTP con una constante de disociación ca. 35 mM (Correia, Baty et al. 1987), es decir aproximadamente 3 órdenes de magnitud más débil que la unión del Zn^{2+} . La concentración total de Mg^{2+} empleada, ca. 100 μM después de sustraer el Mg^{2+} unido a la tubulina, es del mismo orden de magnitud que el rango de concentraciones de Zn^{2+} en el que se observa el cambio en la señal de dicroísmo circular. Al menos para concentraciones de Zn^{2+} similares o mayores a las de Mg^{2+} , el desplazamiento en la unión del Zn^{2+} al GTP por el Mg^{2+} puede despreciarse sin introducir un error significativo en el modelo.

La concentración libre de Zn^{2+} presente en las condiciones en que se midió el dicroísmo circular, varió entre ca. 11 μM y ca. 280 μM , correspondientes a 0.1 y 0.5 mM de Zn^{2+} total, respectivamente (figura 80a).

El estudio de la dependencia del cambio en la señal de dicroísmo circular con la concentración de Zn^{2+} muestra una clara transición entre 0.1 mM y 0.2 mM. A 0.1 mM de Zn^{2+} total le corresponde una concentración libre de ca. 11 μM a la cual están ocupados aproximadamente el 69% de los sitios de alta afinidad y menos del 3% de los de baja afinidad (figura 80b). A 0.2 mM de Zn^{2+} total la concentración libre calculada es ca. 48 μM , están ocupados aproximadamente el 91% de los sitios de alta afinidad y aproximadamente el 11% de los de baja afinidad. El cambio conformacional inducido por la unión de Zn^{2+} , en presencia de MES y glicerol, parece estar asociado con la unión del catión a unos pocos sitios de baja afinidad.

A baja temperatura el cambio detectado en la señal de dicroísmo no está relacionado con un proceso de polimerización u oligomerización, al menos hasta 2 mM de Zn^{2+} total no se ha detectado la presencia de especies de agregación. Sin embargo la forma en presencia de Zn^{2+} -MES-glicerol parece estar relacionada con la polimerización en hojas. Las hojas inducidas por Zn^{2+} no se forman en un rango bajo de concentraciones de Zn^{2+} en el que el

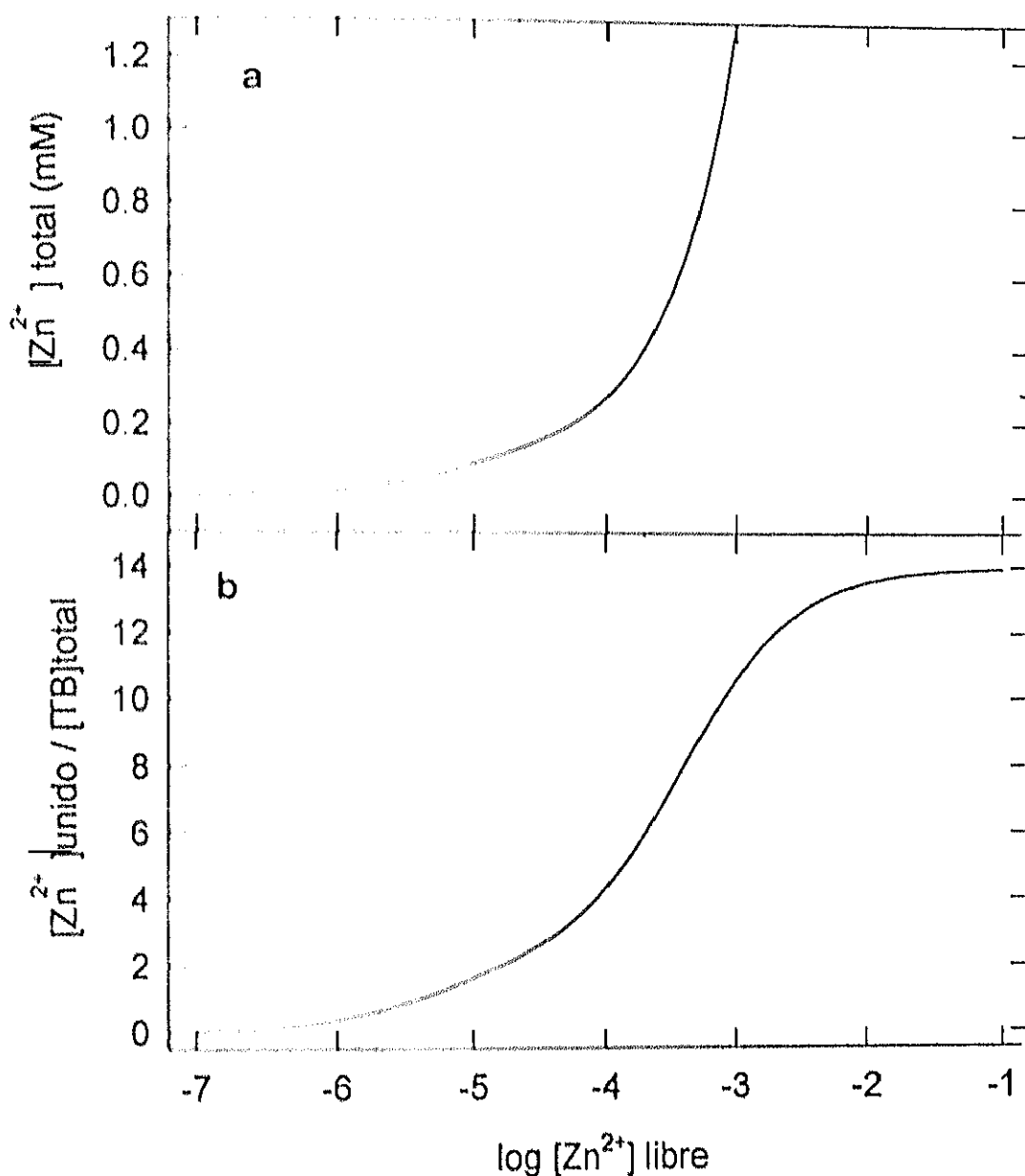


Figura 80. Representación de la relación teórica entre la concentración libre de Zn^{2+} y la concentración total en tampón 100 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM GTP, pH 6.5, en presencia de 2.0 mg/ml de tubulina (panel a), y el número de moles de Zn^{2+} unido por mol de dímero de tubulina (panel b). Se ha considerado un modelo con 2 sitios de unión de alta afinidad y 12 sitios de baja afinidad (Melki y Carrier, 1993).

cación se une exclusivamente a los sitios de alta afinidad, por debajo de $150 \mu\text{M}$ Zn^{2+} total (Melki y Carlier 1993). En ausencia de glicerol, condiciones en las que no se detecta cambio en la señal de dicroísmo, si hay formación de polímeros. Funcionalmente las hojas inducidas por Zn^{2+} en ausencia de glicerol son diferentes a las obtenidas en presencia de este cosolvente. Sin glicerol la concentración crítica es mayor y los polímeros son muy sensibles a la despolimerización por frío. Podría existir una diferencia estructural entre ambos tipos de hojas inducidas por Zn^{2+} . Se ha descrito la formación de dos tipos de polímeros de tubulina en presencia de Zn^{2+} según las condiciones de polimerización (Wolf, Mosser et al. 1993).

Es difícil precisar la naturaleza del cambio conformacional. El análisis de los espectros de dicroísmo circular mediante métodos de deconvolución, tanto lineales como no lineales, rinde resultados ambiguos y contradictorios según el método empleado (datos no presentados).

En la hojas inducidas por Zn^{2+} , tras la hidrólisis del nucleótido se libera el fosfato γ , sin embargo, al contrario de los que ocurre en los microtúbulos, su sitio es inaccesible a los análogos AlF_4^- y $\text{BeF}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Se ha propuesto que de alguna forma, y al menos en el entorno del sitio intercambiable de nucleótido la conformación de la tubulina en las hojas inducidas por Zn^{2+} es diferente de la conformación de la tubulina en los microtúbulos (Melki y Carlier 1993).

La existencia de un cambio conformacional concomitante con la polimerización en hojas inducidas por Zn^{2+} puede plantear cierta ambigüedad en la interpretación de los resultados de proteólisis limitada, sin embargo esta es sólo parcial. Se pueden distinguir 3 casos. (1) Aquellos puntos de corte que son accesibles en la tubulina no polimerizada y en las hojas, en este caso a pesar de poder existir una variación en la estructura estos residuos sabemos que se localizan en la superficie de la proteína accesible en el polímero. (2) Aquellos puntos de corte que sólo se observan en la digestión de la forma ensamblada, se deduce que los residuos implicados en estos puntos hipotéticos también se localizan en la superficie de la proteína accesible en el polímero y además que estarían implicados o afectados por el cambio en la estructura secundaria. (3) Aquellos puntos de corte que se protegen en la digestión de la tubulina polimerizada; es el único caso que puede presentar ambigüedad en la interpretación, ya que la protección podría deberse a estar ocultos en una de las zonas de interacción lateral o longitudinal, o estar protegido por la modificación

estructural. En este último caso la combinación de la información proteolítica de la tubulina ensamblada en microtúbulos inducidos por taxol permite suponer, si el punto de corte se protege en ambos polímeros, su localización en las zonas de contacto longitudinal o lateral. Esto no excluye que en las regiones de contacto pueda existir alteración de la estructura entre ambos polímeros (ver más abajo la interpretación de las consecuencias de la polimerización en la accesibilidad).

La posible existencia de un cambio conformacional en la tubulina polimerizada en las hojas inducidas por Zn^{2+} tiene implicaciones más allá del presente estudio. Aunque estos polímeros no aparecen *in vivo*, son utilizados frecuentemente para estudiar la estructura de la tubulina (eg. (Amos y Baker 1979; Arévalo, Nieto et al. 1990; Nogales, Wolf et al. 1995)) y sus interacciones con otras proteínas como los motores microtubulares (Kamimura y Mandelkow 1992; Sanghamitra, Wolf et al. 1995). Aunque la estructura de la tubulina en estos polímeros difiera, incluso significativamente, de la del heterodímero en solución o ensamblada en microtúbulos, estos trabajos no están invalidados; pero cualquier extrapolación de las conclusiones estructurales debería tener en cuenta que parece tratarse de estados conformacionales distintos de la proteína.

4.2. PROTEOLISIS LIMITADA DE TUBULINA- Zn^{2+} -GLICEROL NO POLIMERIZADA.

El patrón de proteólisis de la α - y la β -tubulina, digeridas por aquellas proteasas que conservan su actividad en presencia de Zn^{2+} , en tampón 10 mM MES, 3.4 M glicerol, 0.1 mM $MgCl_2$, 1 mM GTP, 0.3 mM $ZnCl_2$, pH 6.5 es muy similar al observado en tampón fosfato con 6 mM Mg^{2+} en ausencia de Zn^{2+} y glicerol. Se observan aproximadamente los mismos sitios de corte, con igual distribución en 4 regiones de digestión preferencial (figura 81 y 82).

A pesar de ello es posible apreciar dos diferencias, en la digestión de las cadenas α y β respectivamente. En ambos casos estas alteraciones se localizan en la región proteolítica D, en el extremo carboxilo. En la digestión de α -tubulina con elastasa es característica la aparición de un nuevo punto de corte en esta región. En la β -tubulina, de los 3 puntos de corte producidos por subtilisina en la región carboxilo terminal, sólo se detectan 2 en estas

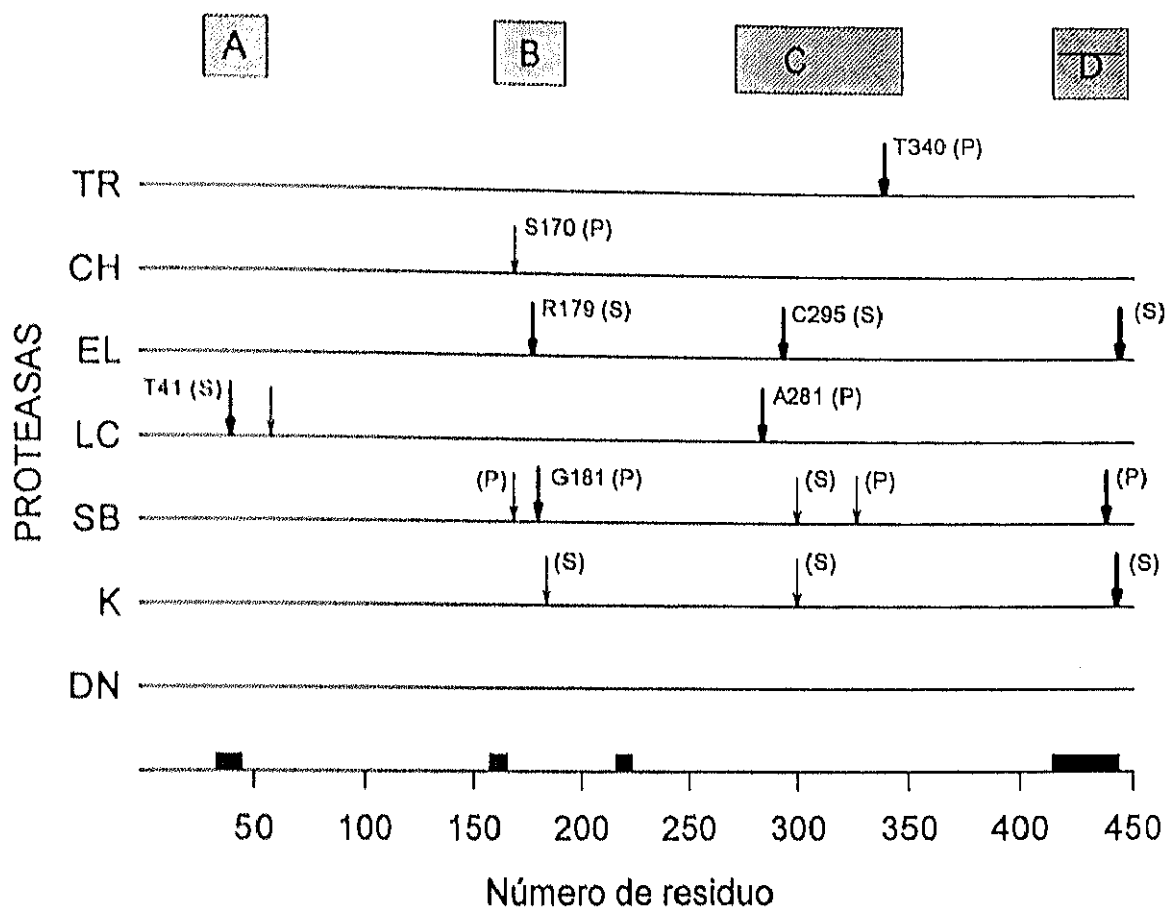


Figura 81. Mapa de proteólisis limitada de α -tubulina en presencia de Zn^{2+} , por 7 proteasas. Cualitativamente se distinguen dos tipos de puntos de corte: en trazo grueso se indican los cortes mayoritarios y en trazo fino los minoritarios. Los números junto a las flechas indican la posición del primer residuo tras el corte. Junto a cada flecha se indica entre paréntesis si el punto de corte es sensible en la tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} y glicerol (s) o si se protege en el polímero (p). Los paréntesis a los lados de las flechas representan la zona de incertidumbre en la ubicación de los puntos de corte. Se han localizado a partir del peso molecular aparente corregido y la reactividad con los anticuerpos mono-específicos indicados como rectángulos negros en la parte inferior. Los rectángulos en la parte superior (A, B, C y D) marcan la extensión aproximada de las regiones sensibles en proteólisis limitada.

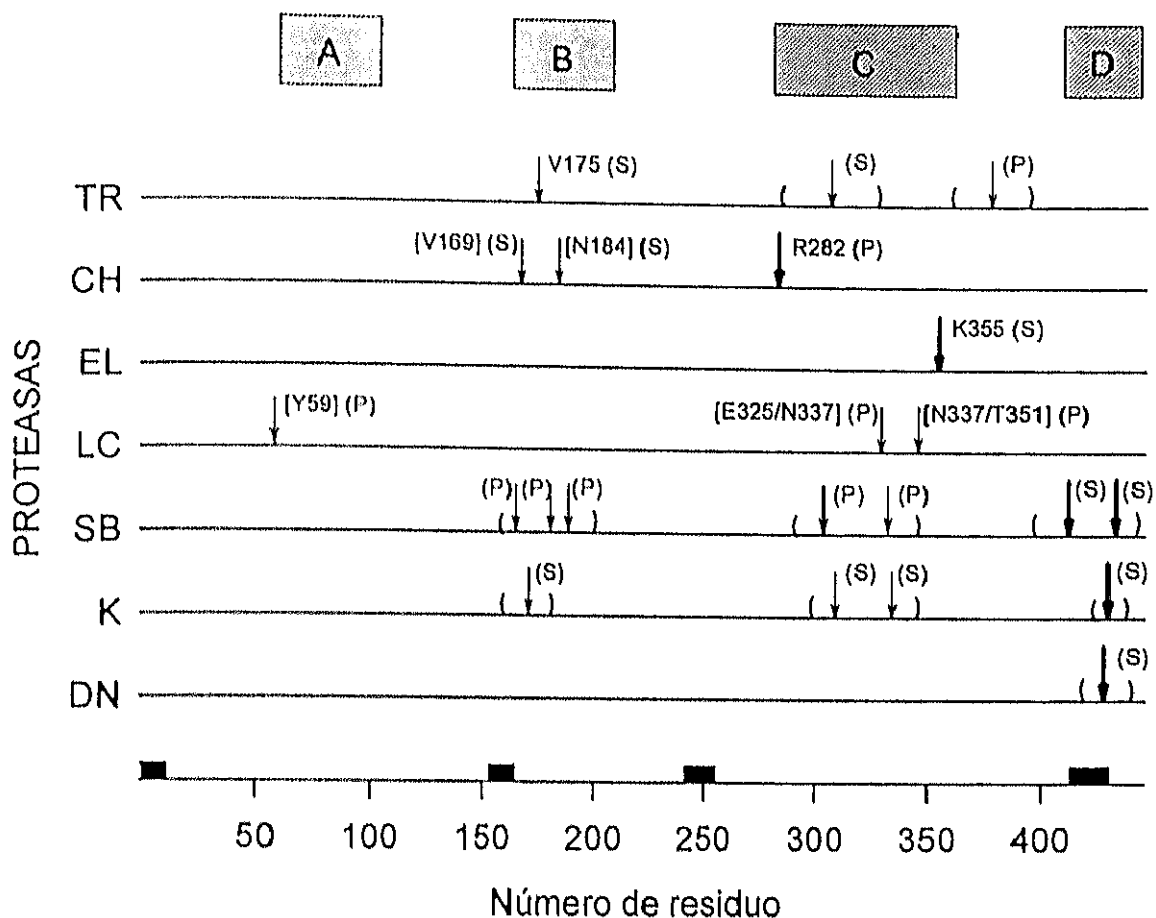


Figura 82. Mapa de proteólisis limitada de β -tubulina en presencia de Zn^{2+} , por 7 proteasas. Cualitativamente se distinguen dos tipos de puntos de corte: en trazo grueso se indican los cortes mayoritarios y en trazo fino los minoritarios. Los números junto a las flechas indican la posición del primer residuo tras el corte, se indican entre corchetes las posiciones asignadas putativamente. Junto a cada flecha se indica entre paréntesis si el punto de corte es sensible en la tubulina polimerizada en hojas inducidas por Zn^{2+} y glicerol (s) o si se protege en el polímero (p). Los paréntesis a los lados de las flechas representan la zona de incertidumbre en la ubicación de los puntos de corte. Se han localizado a partir del peso molecular aparente corregido y la reactividad con los anticuerpos mono-específicos indicados como rectángulos negros en la parte inferior. Los rectángulos en la parte superior (A, B, C y D) marcan la extensión aproximada de las regiones sensibles en proteólisis limitada.

condiciones.

En la subregión C_{II} de β -tubulina se observa un punto de corte minoritario producido por tripsina en torno a la posición 368, sin embargo el fragmento Z-TB β 1 producido en este corte se detecta aunque con dificultad, en las muestras digeridas en tampón fosfato sin Zn²⁺ ni glicerol (datos no presentados).

La localización en el extremo carboxilo de las dos únicas diferencias notables en la digestión controlada de tubulina en presencia de Zn²⁺, sugiere la existencia de una modificación de la estructural de esta región cuando interacciona con Zn²⁺ respecto al estado en presencia de Mg²⁺. En esta región es posible que se localice alguno de los tipos de sitios de unión de Zn²⁺ observados (Eagle, Zombola et al. 1983; Melki y Carlier 1993). El extremo carboxilo se ha propuesto como zona de localización del sitio de unión de otros cationes divalentes como el Ca²⁺ (Serrano, Valencia et al. 1986). A partir del estudio de la fijación de ⁶⁵Zn a fragmentos de tubulina transferidos a membranas de nitrocelulosa, se ha propuesto que el primer tercio de la secuencia de α - y β -tubulina fijan este catión (Serrano, Domínguez et al. 1988); este resultado, obtenido con tubulina y fragmentos desnaturalizados, no descarta la presencia de sitios de unión de alta o baja afinidad en la región carboxilo terminal.

Esta modificación estructural de la región carboxilo terminal por efecto del Zn²⁺ no está relacionada con el cambio conformacional inducido por Zn²⁺, detectado por un cambio en el espectro de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano. El patrón característico de proteólisis del extremo carboxilo se observa en muestras digeridas en tampón 10 mM MES, 3,4 M glicerol, 0.1 mM MgCl₂, 1 mM GTP, pH 6.5, condiciones en las que el espectro de dicroísmo circular de la tubulina es similar al obtenido en condiciones estándar.

4.3. EFECTO DE LA POLIMERIZACIÓN EN HOJAS SOBRE LA ACCESIBILIDAD A PROTEASAS.

El efecto más directo de la polimerización de la tubulina en hojas inducidas por Zn²⁺ es la oclusión de las superficies de las proteínas que participan en los contactos intermoleculares del polímero. En estas estructuras el heterodímero $\alpha\beta$ establece dos tipos

de interacciones: longitudinales a lo largo de un mismo protofilamento y laterales en la agregación de estos.

La estructura de los protofilamentos de las hojas inducidas por Zn^{2+} es compatible con la de los protofilamentos de los microtúbulos, siendo las dimensiones de la unidad de repetición longitudinal 8 nm, asignada al heterodímero de $\alpha\beta$ (Amos y Baker 1979). A efectos de accesibilidad a proteasas, las superficies ocluidas en los contactos longitudinales se consideran equivalentes en los protofilamentos de ambas estructuras.

La ordenación de los protofilamentos en las hojas inducidas por Zn^{2+} es apreciablemente diferente a la de los microtúbulos. En estos últimos, todos los protofilamentos tienen igual polaridad y de las dos superficies diferenciadas que no participan en los contactos laterales, todos orientan las mismas superficies hacia el exterior y el interior del microtúbulo respectivamente. Sin embargo en las hojas inducidas por Zn^{2+} los protofilamentos se disponen alternando la polaridad y la orientación de sus superficies diferenciadas (interna y externa, por analogía con la disposición en los microtúbulos), con simetría $P2_1$ (Baker y Amos 1978). Consecuentemente en las hojas inducidas por Zn^{2+} la topología de los contactos inter-protofilamentos es diferente y en ella interaccionan distintas regiones de la tubulina entre sí, respecto a los microtúbulos. A partir de estudios estructurales a baja resolución se acepta que las regiones implicadas en los contactos laterales son similares en las dos estructuras (Amos y Baker 1979), y por lo tanto están igualmente ocluidas. Asimismo, la semejanza de los parámetros termodinámicos del ensamblaje de microtúbulos y hojas inducidas por Zn^{2+} indica que los contactos laterales hidrofóbicos tienen dimensiones comparables en ambos polímeros (Melki y Carlier 1993).

Por ser las hojas inducidas por Zn^{2+} redes bidimensionales, la superficie de los protofilamentos equivalente a la orientada hacia el lumen en los microtúbulos es accesible a las proteasas. Muy simplificado, y exclusivamente a efectos de discusión de la accesibilidad a proteasas, las hojas inducidas por Zn^{2+} se pueden considerar equivalentes a microtúbulos abiertos.

4.4. PROTEOLISIS LIMITADA DE HOJAS INDUCIDAS POR Zn^{2+} : COMPARACIÓN CON LOS MICROTÚBULOS INDUCIDOS POR TAXOL.

La polimerización de la $\alpha\beta$ tubulina en hojas inducidas por Zn^{2+} conlleva la protección de más puntos de corte, proporcionalmente al número de proteasas, que el ensamblaje en microtúbulos inducidos por taxol.

En las regiones A se observa un comportamiento diferenciado en α - y β -tubulina. En α -tubulina polimerizada esta región se mantiene expuesta y sensible. En la cadena β el punto de digestión minoritario producido por la endoproteinasa Lys-C se protege al polimerizar.

De forma general las regiones B se protegen más en las hojas inducidas por Zn^{2+} que en los microtúbulos. La protección al ataque proteolítico no es homogénea ni total, en esta región, en ninguna de las dos proteínas. En la α -tubulina se protegen los enlaces 169-170 y 180-181, sin embargo el enlace 178-179 sí es accesible a elastasa en el polímero. En β -tubulina polimerizada se protegen 3 puntos de corte producidos por subtilisina, pero se mantienen sensibles los cortes con tripsina, quimotripsina y proteinasa K.

Hemos propuesto con anterioridad que la región preferencial de proteólisis B se localiza en la cara externa de los microtúbulos, muy próxima espacialmente a la zona de contactos entre protofilamentos. Esta localización es compatible con los resultados observados en las hojas inducidas por Zn^{2+} . El comportamiento diferente se explica por modificarse las superficies de contacto entre los protofilamentos de ambas estructuras. El espaciado lateral entre protofilamentos de las hojas de Zn^{2+} es 4.8-4.9 nm (Amos y Baker 1979), apreciablemente inferior al espaciado entre protofilamentos en el radio helicoidal medio (10.8 nm) de la pared microtubular, de ca. 5.6 nm (Andreu, Bordas et al. 1992). Los polímeros bidimensionales presentan un mayor grado de empaquetamiento lateral que un polímero cilíndrico. Una hendidura longitudinal entre protofilamentos, como la presente en la cara externa de los microtúbulos o equivalente, no se observa en las hojas inducidas por Zn^{2+} . En consecuencia la superficie de la tubulina expuesta en la cara externa de los microtúbulos se ve ocluida parcialmente en las hojas inducidas por Zn^{2+} , en las zonas limítrofes con las superficies implicadas en los contactos laterales.

En la región C sensible a proteasas de α -tubulina, la polimerización en hojas inducidas por Zn^{2+} protege los mismos enlaces que el ensamblaje en microtúbulos. La

proteolisis de estos últimos se caracteriza por la presencia en la subregión C_B de un corte minoritario, producido por tripsina, localizado ca. 10 a 15 residuos antes de la posición 339. En la digestión de las hojas inducidas por Zn^{2+} no se detecta esta posición de corte. Tal como se ha propuesto esta región se localiza en la superficie externa de los microtúbulos, muy próxima a la zona de interacción lateral. La extensión de la zona ocluida en los contactos laterales de las hojas de Zn^{2+} , respecto a los microtúbulos, explica su ausencia de sensibilidad a la proteasa por oclusión.

En las hojas inducidas por Zn^{2+} la subregión C_A de β -tubulina se ocluye a las proteasas en igual medida que en los microtúbulos inducidos por taxol. Sin embargo se observa una mayor protección de la subregión C_B , en concreto de los puntos de corte producidos por endoproteinasa Lys-C y por subtilisina. Indica un paralelismo con la proteolisis de la cadena α y apoya la hipótesis de una extensión de la zona de contacto lateral en los polímeros de tubulina con disposición plana de los protofilamentos.

Como hemos observado parece haber un cambio en la estructura secundaria de la tubulina al unir Zn^{2+} en presencia de MES y glicerol, condiciones en las que comúnmente se realiza la polimerización de hojas inducidas por este catión. Las zonas de la tubulina sensibles a proteasas en esta forma ensamblada se localizan en la superficie de la proteína y son accesibles en el polímero. Estos enlaces no se ocluyen en el proceso de polimerización o en una posible reorganización estructural, independientemente de que esta última produzca.

Las hojas inducidas por Zn^{2+} han sido un atractivo objeto de atención en estudios de la estructura de tubulina ya que son polímeros con alto grado de ordenación y pueden ser considerados como cristales bidimensionales (eg. Erickson 1974; Baker y Amos 1978, Wolf 1993). El conjunto de residuos expuestos en las hojas inducidas por Zn^{2+} , determinados en este trabajo, constituyen unas constricciones estructurales que han de ser satisfechas por cualquier posible estudio estructural, basado en estos polímeros, en el que se intente trazar la cadena polipeptídica (ver Nogales, Wolf et al. 1995).

5. MODELO DE ESTRUCTURA DE LAS REGIONES α (103-172) Y β (93-170) DE TUBULINA Y (66-139) DE FtsZ.

En tubulinas estas dos regiones se extienden secuencialmente antes de las regiones B de digestión preferencial. La información experimental disponible sobre estas regiones y su entorno, combinada con los datos de predicción de estructura, permite proponer un modelo local de estructura supersecundaria (figura 83).

Estas regiones contienen secuencias directamente implicadas en la unión del nucleótido. Por ser el sitio de unión de nucleótido de la subunidad β intercambiable se dispone de mayor información experimental sobre la región de esta cadena. Como se ha descrito experimentalmente, los dos extremos de la secuencia β (93-170) se localizan en la superficie de la tubulina. Esta secuencia se corresponde con la región resistente a la digestión controlada que se extiende entre las regiones sensibles A y B. En el lado amino el enlace G93-Q94 es digerido por bromelaina, y en el lado carboxilo se localizan varios puntos de corte (eg. quimotripsina digiere entre F167-S168). Que el final carboxilo de esta región esta expuesto al solvente lo confirma la unión a tubulina nativa del anticuerpo anti- β (153-165) (Arévalo, Nieto et al. 1990). Topológicamente ambos están orientados hacia la cara externa de los microtúbulos, por lo tanto la distancia máxima entre los enlaces G93-Q94 y K174-V175 es aproximadamente 7 nm, correspondiente a la diagonal mayor de la superficie del monómero de tubulina externa en el microtúbulo.

Se ha propuesto que el segmento β (102-109) es equivalente al motivo de unión de los fosfatos α y β del nucleótido en proteínas que unen GTP, denominándose "*bucle-P invertido*", ya que su secuencia aparece invertida en tubulinas (Sage, Davis et al. 1991; Davis, Sage et al. 1994). La secuencia β (140-146) es rica en Gly y se supone análoga al bucle de unión del fosfato del nucleótido en proteínas que unen ATP/ADP (ver introducción). Por lo tanto ambas regiones se localizan en el interior de la proteína. Por estar implicadas en la unión de la cadena de fosfatos del nucleótido, ambos bucles se localizan próximos espacialmente.

La predicción de estructura secundaria para esta región confirma la estructura de bucle para las dos secuencias implicadas en la unión del nucleótido. La secuencia β (109-124) tiene un marcado potencial de α -hélice (β H2) y para β (132-138) se predice estructura de lámina

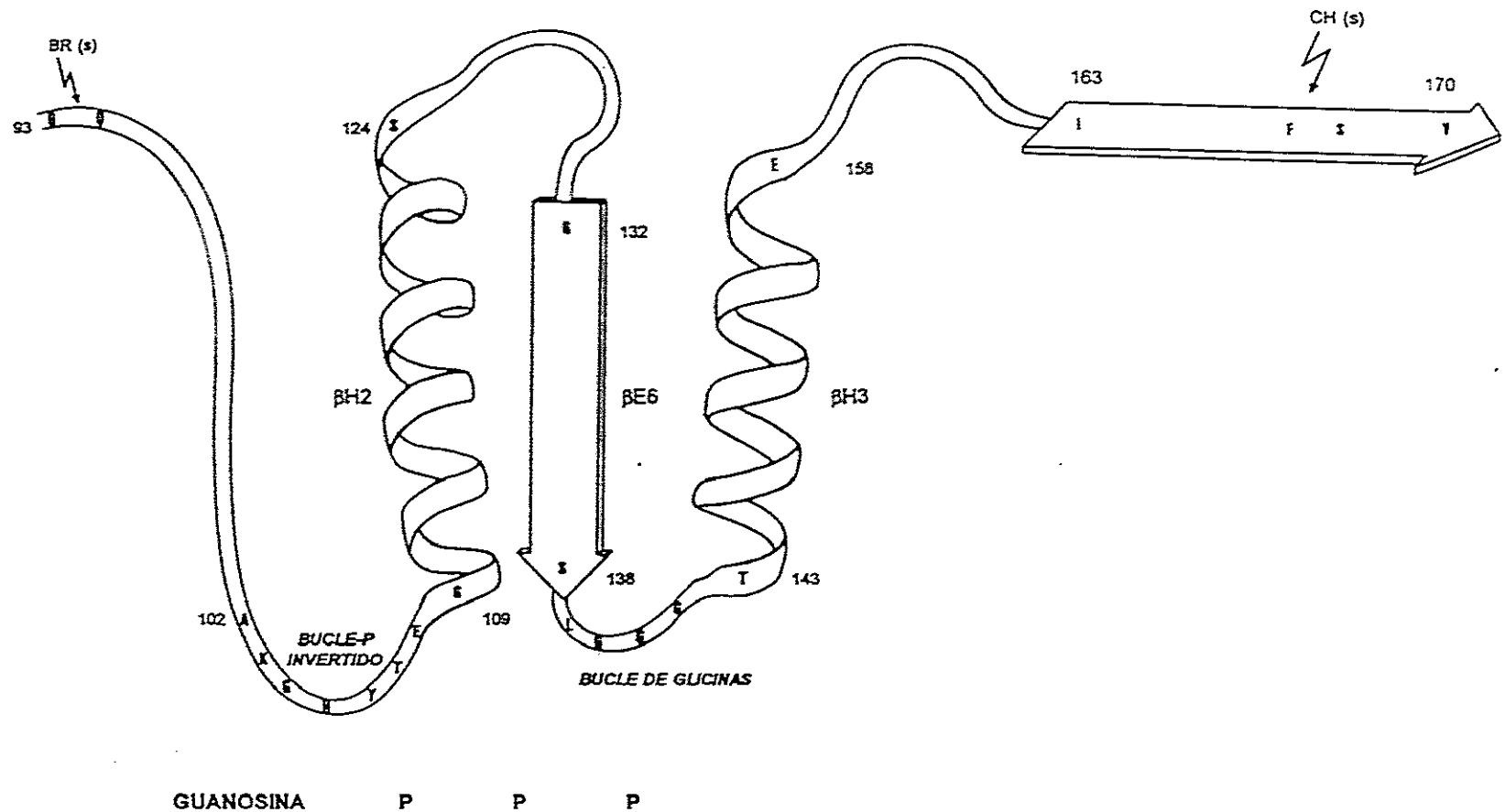


Figura 83. Representación esquemática de una posible estructura de la región 93-170 de β -tubulina. La figura ilustra: (1) la similitud de dimensiones de los elementos de estructura secundaria $\beta H2$, $\beta E6$ y $\beta H3$. (2) la localización espacial próxima del bucle-P invertido y del bucle de glicinas. (3) la potencial interacción entre la hélice $\beta H2$ y el segmento extendido $\beta E6$. (4) la localización en la superficie de la proteína de las secuencias 93-94, 125-131 y 159-170.

β ($\beta E6$). Estos dos elementos están unidos por un bucle de 6 residuos. La longitud de la hélice $\beta H2$ es aproximadamente 2.1 a 2.4 nm, y es muy similar a la extensión del segmento de lámina $\beta E6$, entre 1.7 y 2.3 nm. Por estar próximos espacialmente el bucle-P invertido y la región rica en Gly, el extremo amino de la hélice debería localizarse próximo al extremo carboxilo de la lámina. La proximidad de los extremos de estos dos elementos indica una disposición paralela de los mismos y muy probablemente una interacción entre ambos. La hélice $\beta H2$ tiene carácter anfipático. La cara hidrofóbica de esta hélice es la zona potencial de contacto con el segmento $\beta E6$, para el que se predice una baja accesibilidad del solvente. La interacción entre estos 2 elementos implica una rigidez estructural del conjunto, la cual explicaría la escasa sensibilidad a las proteasas del bucle $\beta(124-132)$ a pesar de tener asignada una predicción de marcada exposición al solvente. El único punto de corte posiblemente localizado en esta zona es el enlace K122-E123 de β -tubulina; la clostripaina parece digerir de forma minoritaria este enlace. Se ha estudiado la inmunoreactividad de esta secuencia, que coincide con un máximo de antigenicidad según de la Viña y col (de la Viña, Andreu et al. 1988). Según el presente modelo este epítipo debería ser reconocido en el heterodímero de tubulina, y sería de gran importancia determinar su grado de exposición en microtúbulos y hojas inducidas por Zn^{2+} con el fin determinar más precisamente la ordenación espacial de los elementos de estructura secundaria existentes en la región $\beta(93-167)$. Sin embargo anticuerpos frente a péptidos homólogos de las secuencias $\alpha(120-131)$ y $\beta(119-129)$ no reaccionan ni con tubulina nativa ni desnaturalizada (Arévalo, Nieto et al. 1990).

El segmento final de la región rica en Gly y la secuencia siguiente tienen elevado potencial de α -hélice ($\beta H3$). En el extremo amino de esta hélice predomina el carácter oculto y en el carboxilo el expuesto. Esta polaridad es coincidente con una orientación de la hélice $\beta H3$ desde el sitio de unión del nucleótido, en el interior de la proteína, hacia la superficie. Al ser la hélice un elemento relativamente rígido, se explica que un anticuerpo frente a la región $\beta(154-165)$ inhiba la incorporación de GTP a la β -tubulina (Hesse, Thierauf et al. 1987) por alteración de la estructura del sitio de unión, transmitida a lo largo de la α -hélice.

Aunque $\beta H3$, y posiblemente la lámina $\beta E6$, conectan el bucle de Gly en el sitio de unión del nucleótido con la superficie de la proteína, y sus dimensiones son similares, no hay

información que permita suponer una interacción directa entre la α -hélice $\beta H3$ y la α -hélice $\beta H2$ o el segmento de lámina $\beta E6$. Su disposición relativa es *a priori* independiente.

Suponiendo, como hemos visto, que $\beta H2$ y $\beta E6$ pueden formar una estructura relativamente compacta, se puede definir un hipotético ángulo diédrico entre el bucle $\beta(93-102)$ y $\beta H3$. Su disposición relativa está restringida por localizarse los extremos de ambos elementos en la superficie de la tubulina orientada hacia la cara externa de los microtúbulos (ver antes). Se pueden descartar valores cercanos a 180° para este hipotético ángulo, ya que una disposición elongada no es compatible con los datos bioquímicos e immunoquímicos.

Como la región B se localiza en la cara externa de los microtúbulos, próxima a la superficie de contacto lateral entre protofilamentos (ver antes), y la longitud aproximada de α -hélice $\beta H3$ es de 2.3 a 2.4 nm. Siendo el espesor de la pared de los microtúbulos aproximadamente 7 a 8 nm. Se deduce que el sitio de unión de nucleótido se localiza en la mitad exterior de la pared microtubular.

Por ser el sitio de unión de nucleótido de la α -tubulina no intercambiable, no se dispone de evidencias experimentales sobre las secuencias implicadas en la unión del nucleótido a esta cadena. Existen una serie de similitudes entre las regiones $\alpha(103-164)$ y $\beta(102-162)$ que indican una homología estructural de estas regiones. Al igual que en la cadena β , tras la región $\alpha(103-164)$ se extiende una zona sensible a proteasas y el epítipo $\alpha(153-165)$ es reconocido en la proteína nativa (Arévalo, Nieto et al. 1990); el final de esta región se localiza en la superficie de la proteína. Los bucles implicados en la unión del nucleótido, bucle-P invertido y bucle de glicinas, están conservados en ambas subunidades. Hay una gran homología en la predicción de estructura secundaria entre ambas cadenas.

La comparación de la predicción de estructura secundaria de FtsZ y β -tubulina muestra homología estructural entre las regiones $\beta(103-177)$ y FtsZ(66-139). La predicción de estructura secundaria para estas dos regiones se caracteriza por tener un elevado grado de confianza, por lo que ambas regiones podrían formar parte de lo que parece constituir un "núcleo predecible", aparentemente presente en las proteínas (Barton 1995). Esta elevada fiabilidad de la predicción puede reflejar una baja variabilidad de la estructura secundaria de estas regiones dentro de las respectivas familias de proteínas. Esta variabilidad es una

característica intrínseca de las familias de proteínas de estructura homóloga, y afecta principalmente a la extensión de los elementos estructurales (Chothia y Lesk 1986). En resumen se puede inferir que los elementos estructurales de estas regiones están altamente conservados, posiblemente debido a su importancia funcional ya que a ellos se debe la correcta geometría de los dos bucles implicados presuntamente en la unión e hidrólisis del nucleótido.

Un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo en la secuencia 79-97 de FtsZ reacciona con la proteína en condiciones nativas (Voskuil, Westerbeek et al. 1994). Esta zona comprende la hélice α z14 y el bucle siguiente. La presencia de un epítipo expuesto, que probablemente incluya al bucle 94-96, es compatible con la homología estructural con tubulinas, ya que como hemos indicado anteriormente, el bucle equivalente en tubulina debería localizarse en la superficie de la proteína. De forma análoga es una idea estimulante comprobar la sensibilidad a proteasas de la zona 123-140 de FtsZ, ya que en ella podemos predecir la localización de puntos de corte. Estos resultados darían importante información sobre la posible localización superficial del segmento de lámina β zE5, a pesar de tener una marcada asignación oculta (predominante en la secuencia de FtsZ, ver antes).

Conclusiones

1- La proteólisis limitada de la $\alpha\beta$ tubulina heterodimérica se produce selectivamente en zonas definidas de la secuencia. Las zonas $\alpha(40-43)$, $\alpha(60-61)$, $\alpha(160-181)$, $\alpha(280-295)$, $\alpha(339-340)$, $\alpha(430-451)$, $\beta(58-59)$, $\beta(93-94)$, $\beta(167-184)$, $\beta(277-283)$, $\beta(354-355)$ y $\beta(400-445)$ se localizan en la superficie del heterodímero y son accesibles al ataque de endoproteinasas.

2- Los puntos de ataque proteolítico se localizan mayoritariamente en zonas con predicción de estructura secundaria de bucle o desordenada.

3- Los residuos de α -tubulina: K40-T41-I42, K59-H60, D160-Y161, E168-F169-S170, S178-T179-A180-V181, E290-I291 y A293-C294; y los de β : K58-Y59, G93-Q94, F168-S169, K174-V175, Y183-N184, G277-S278, C355-D356, se localizan en la superficie de los microtúbulos.

4- Los residuos de α -tubulina: K280-A281 y R339-T340; y los de β : Y281-R282-A283 se protegen en los microtúbulos, localizándose posiblemente en la zona de contacto entre protofilamentos.

5- La zona carboxilo terminal de α -tubulina se protege parcialmente del ataque por proteasas en los microtúbulos. La zona carboxilo terminal de β -tubulina aumenta su sensibilidad a las proteasas como consecuencia del ensamblaje.

6- La tubulina en presencia de Zn^{2+} , glicerol y MES, sufre un cambio en su característico espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano, indicativo de un cambio en la estructura secundaria promedio.

7- El patrón de proteólisis controlada de tubulina en presencia de Zn^{2+} y concentración submilimolar de Mg^{2+} es similar al observado en tampón fosfato y 6mM Mg^{2+} . Las únicas diferencias cualitativamente significantes se localizan en la digestión del extremo carboxilo de α - y β -tubulina.

8- Los residuos de α -tubulina: K40, T41, S178, T179, A294 y C295, y los de β : K58, Y59, F168, S169, K174, V175, Y183 y N184, se localizan en la superficie de las hojas inducidas por Zn^{2+} .

9- Hay una homología entre la estructura secundaria de las tubulinas y la proteína de la división bacteriana FtsZ. El mayor segmento con homología estructural comprende las regiones (99-177) de β -tubulina de cerebro porcino y (67-139) de FtsZ de *Escherichia coli*, que incluyen dos motivos de secuencia implicados en la unión del nucleótido y para las que se propone un modelo de plegamiento.

Bibliografía

- Aizawa, H., Emori, Y., Mori, A., Murofushi, H., Sakai, H., y Suzuki, K. (1991) "Functional analysis of the domain structure of microtubule associated protein 4 (MAP-U)." J. Biol. Chem., 266, 9841-9846.
- Alexander, J. E., Hunt, D. F., Lee, M. K., Shabanowitz, J., Michel, H., Berlin, S. C., Macdonald, T. L., Sundberg, R. J., Rebhun, L. I., y Frankfurter, A. (1991) "Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III β -tubulin by mass spectrometry" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4685-4689.
- Amos, L. A., y Baker, T. S. (1979) "The three-dimensional structure of tubulin protofilaments." Nature, 279, 607-612.
- Amos, L. A., y Klug, A. (1974) "Arrangement of subunits in flagellar microtubules" J. Cell Sci., 14, 523-549.
- Andreu, J. M., Bordas, J., Diaz, J. F., García de Aencos, J., Gil, R., Medrano, F. J., Nogales, E., Pantos, E., y Towns-Andrews, E. (1992) "Low resolution structure of microtubules in solution." J. Mol. Biol., 226, 169-184.
- Andreu, J. M., De la Torre, J., y Carrascosa, J. L. (1986) "Interaction of tubulin with octyl glucoside and deoxycholate. 2. Protein conformation, binding of colchicine ligands, and microtubule assembly." Biochemistry, 25, 5230-5239.
- Andreu, J. M., y de Pereda, J. M. (1993) "Site-directed antibodies to tubulin" Cell Motil. Cytoskeleton.
- Andreu, D., de la Viña, S., y Andreu, J. M. (1988) "Chemical synthesis of five tubulin antigenic sequences." Int. J. Peptide Protein Res., 31, 555-566.
- Andreu, J. M., Gorbunoff, M. J., Lee, J. C., y Timasheff, S. N. (1984) "Interaction of tubulin with bifunctional colchicine analogues: an equilibrium study." Biochemistry, 23, 1742-1752.
- Andreu, J. M., y Timasheff, S. N. (1982) "Interaction of tubulin with single sing analogues of colchicine" Biochemistry, 21, 534-543.
- Arévalo, M. A., Nieto, J. M., Andreu, D., y Andreu, J. M. (1990) "Tubulin assembly probed with antibodies to synthetic peptides" J. Mol. Biol., 214, 105-120.
- Audenaert, R., Heremans, L., Heremans, K., y Engelborghs, Y. (1989) "Secondary structure analysis of tubulin and microtubules with Raman spectroscopy." Biochem. Biophys. Acta, 996, 110-115.
- Bairoch, A., y Boeckmann, B. (1991) "The SWISS-PROT sequence data bank." Nucleic Acids Res., 19, 2247-2250.
- Bajer, A. S. (1982) "Functional autonomy of monopolar spindle and evidence of oscillatory movement in mitosis" J. Cell Biol., 93, 33-48.

- Bajer, A. S., y Mole-Bajer, J. (1972). *Spindle dynamics and chromosome movements*. Orlando, Florida: Academic Press.
- Baker, T. S., y Amos, L. A. (1978) "Structure of the tubulin dimer in Zinc-induced sheets." J. Mol. Biol., 123, 89-106.
- Barra, H. S., Arce, C. A., y Caputto, R. (1980) "Total tubulin and its aminoacetylated and non-aminoacetylated forms during the development of rat brain." Eur. J. Biochem., 109, 439-446.
- Barton, G. J. (1995) "Protein secondary structure prediction." Curr. Opinion Struc. Biol., 5, 372-376.
- Beall, B., Lowe, M., y Lutkenhaus, J. (1988) "Cloning and characterization of *Bacillus subtilis* homologs of *Escherichia coli* cell division genes *ftsZ* and *ftsA*." J. Bacteriol., 170, 4855-4864.
- Beese, L., Stubbs, G., y Cohen, C. (1987) "Microtubule structure at 18 Å resolution." J. Mol. Biol., 194, 257-264.
- Bon, Z. A., Farmer, S. R., y Penman, S. (1979) "Mechanisms of regulating tubulin synthesis in cultured mammalian cells." Cell, 17, 319-325.
- Bershadsky, A. D., y Vasiliev, J. M. (1988). *Cytoskeleton*. New York: Plenum Press.
- Best, D., Warr, P. J., y Gull, K. (1981) "Influence of the composition of commercial sodium dodecyl sulphate preparations on the separation of α - and β -tubulin during polyacrylamide gel electrophoresis." Anal. Biochem., 114, 281-284.
- Bhattacharyya, B., Sackett, D. L., y Wolf, J. (1985) J. Biol. Chem., 260, 10208-10216.
- Bi, E., y Lutkenhaus, J. (1993) "Cell division inhibitors SulA and MinCD prevent formation of the FtsZ ring." J. Bacteriol., 175(4), 1118-1125.
- Bi, E. F., y Lutkenhaus, J. (1991) "FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*." Nature, 354(6349), 161-164.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., y McCormick, F. (1991) "The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism" Nature, 349, 117-127.
- Bramhill, D., y Thompson, C. M. (1994) "GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(13), 5813-5817.
- Breitting, F., y Little, M. (1986) "Carboxy-terminal regions on the surface of tubulin and microtubules. Epitope locations of YOL 1/34, DM1A and DM1B." J. Mol. Biol., 189, 367-370.
- Burke, M., Rajasekharan, K. N., Marula, S., y Ikebe, M. (1990) "A second consensus sequence of ATP-requiring proteins residues in the 21-KDa C-terminal segment of myosin subfragment 1." FEBS Letters, 262(185-188).
- Burns, R. G. (1991) " α -, β -, and γ -tubulins: sequence comparisons and structural constraints"

- Cell Motil. and the Cytosk., 20, 181-189.
- Chène, P., Mazarguil, H., y Wright, M. (1992) "Microtubule assembly protects the region 28-38 of the β -tubulin subunit." Cell Motility and the Cytoskeleton, 22, 25-37.
- Choli, T., y Willmann-Liebold, B. (1990) "Protein blotting followed by microsequencing." Electrophoresis, 11, 562-568.
- Chothia, C., y Lesk, A. M. (1986) "The relation between the divergence of sequence and structure in proteins." EMBO J., 5, 823-826.
- Clanton, D. J., Hattori, S., y Shih, T. Y. (1986) "Mutation of the ras gene product p21 that abolish guanine nucleotide binding." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 5076-5080.
- Cleveland, D. W., Lopata, M. A., Sherline, P., y Kirschner, M. W. (1981) "Unpolymerized tubulin modulates the level of tubulin mRNAs" Cell, 25, 537-546.
- Correia, J. J., Baty, L. T., y Williams, R. C. J. (1987) " Mg^{2+} dependence of guanine nucleotide binding to tubulin." J. Biol. Chem., 262(36), 17278-17284.
- Dai, K., Mukherjee, A., Xu, Y., y Lutkenhaus, J. (1994) "Mutations in ftsZ that confer resistance to Sula affect the interaction of FtsZ with GTP." J. Bacteriol., 176(1), 130-136.
- Darnell, J., Lodish, H., y Baltimore, D. (1990). *Molecular Cell Biology*. New York: W.H. Freeman and Co.
- Davis, A., Sage, C. R., Dougherty, C. A., y Farrell, K. W. (1994) "Microtubule dynamics modulated by guanosine triphosphate hydrolysis activity of β -tubulin." Science, 264, 839-842.
- de Boer, P., Crossley, R., y Rothfield, L. (1992) "The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase" Nature, 359, 254-256.
- de Boer, P. A. J., Cook, W. R., y Rothfield, L. I. (1990) "Bacterial cell division" Annu. Rev. Genet., 24, 249-274.
- de Inés, C. (1995) Tesis Doctoral: "Interacción de microtúbulos celulares con anticuerpos específicos y con nuevos compuestos antitumorales." Universidad Autónoma de Madrid.
- de la Viña, S., Andreu, D., Medrano, F. J., Nieto, J. M., y Andreu, J. M. (1988) "Tubulin structure probed with antibodies to synthetic peptides. Mapping of three major types of limited proteolysis fragments" Biochemistry, 27, 5352-5365.
- Downing, K. H., y Jontes, J. (1992) "Projection map of tubulin in zinc-induced sheets at 4 Å resolution." J. Struct. Biol., 109, 152-159.
- Dráber, P., Dráberová, E., Linhartová, I., y Viklický, V. (1989) "Differences in the exposure of C- and N-terminal tubulin domains in cytoplasmic microtubules detected with domain-specific monoclonal antibodies." J. Cell Sci., 92, 519-528.
- Eagle, G. R., Zombola, R. R., y Himes, R. H. (1983) "Tubulin-zinc interactions: binding and

polymerization studies." Biochemistry, 22, 221-228.

Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J. P., Desbruyères, E., Gros, F., y Denoulet, P. (1990) "Posttranslational glutamylation of α -tubulin" Science, 247, 83-85.

Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J. P., Promé, J. C., Desbruyères, E., Gros, F., y Denoulet, P. (1992) "Polyglutamylated α -tubulin can enter the tyrosination/detyrosination cycle" Biochemistry, 31, 403-410.

Eisenberg, D., Weiss, R. M., y Terwilliger, T. C. (1984) "The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 140-144.

Erickson, H. P. (1974) "Microtubule surface lattice and subunit structure and observations on reassembly" J. Cell Biol., 60, 153-167.

Evangelio, J. E. (1995) Tesina de Licenciatura: "Características físico-químicas y potencial α -helicoidal de fragmentos c-terminales de α - y β -tubulina." Tesina de Licenciatura, Universidad Complutense de Madrid.

Farr, G. W., y Sternlicht, H. (1992) "Site-directed mutagenesis of the GTP-binding domain of β -tubulin" J. Mol. Biol., 227, 307-321.

Fellous, A., Francon, J., Lennon, A. M., y Nuñez, J. (1977) "Microtubule assembly in vitro." Eur. J. Biochem., 78, 167-174.

Fontana, A., Fassina, G., Vila, C., Dalzoppo, D., Zamal, M., y Zambonin, M. (1986) "Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin." Biochemistry, 25(8), 1847-1851.

Franz, U. (1939) "Struktur und mechanismus der melanophoren" Z. Zellforsch. mikr. Anat., 30, 194-234.

Frigon, R. P., y Timasheff, S. N. (1975) "Magnesium-induced self-association of calf brain tubulin. I. Stoichiometry" Biochemistry, 14(21), 4559-4566.

Gard, D. L., y Kirschner, M. W. (1985) "A polymer-dependent increase in phosphorylation of β -tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line." J. Cell Biol., 100, 764-774.

Geahlen, R. L., y Haley, B. E. (1977) "Interaction of a photoaffinity analog of GTP with the proteins of microtubules." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 4375-4377.

Gibbons, I. R., Gibbons, B. H., Mocz, G., y Asal, D. J. (1991) "Multiple nucleotide-binding sites in the sequence of dynein β -heavy chain." Nature, 352, 640-643.

Gilbert, S. P., Webb, M. R., Brune, M., y Johnson, K. A. (1995) Nature, 373, 671-676.

Good, N. E., Winget, D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S., y Singh, R. M. M. (1966) "Hydrogen ion buffer for biological research." Biochemistry, 5(2), 467-477.

Green, N., Alexander, H., Olson, A., Alexander, S., Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., y Lerner, R. (1982) "Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin." Cell, 28, 477-487.

Greer, K., Maruta, H., L'Hernault, S. W., y Rosenbaum, J. L. (1985) "Alpha-tubulin acetylase activity in isolated *Chlamydomonas* flagella." J. Cell Biol., 101(6), 2081-2084.

Grim, M., Breilling, F., y Little, M. (1987) "Location of the epitope for the α -tubulin monoclonal antibody TU-01." Biochim. Biophys. Acta, 914, 83-88.

Grimstone, A. V., y Klug, A. (1966) "Observations in the substructure of flagellar fibres" J. Cell. Sci., 1, 351-362.

Hamel, E. (1992). *Microtubule Inhibitors*.

Hecht, N. B., Distel, R. J., Yelick, P. C., Tanhauser, S. M., Driscoll, C. E., Goldberg, E., y Tung, K. S. (1988) "Localization of a highly divergent mammalian testicular alpha tubulin that is not detectable in brain." Mol. Cell Biol., 8(2), 996-1000.

Heidenhain, M. (1899) "Ueber die struktur der darmepithelzellen" Arch. Mikrosk. Anat. Entwicklsg. 54, 184-224.

Hesse, J., Thierauf, M., y Ponstingl, H. (1987) "Tubulin sequence region β 155-174 is involved in binding exchangeable guanosine triphosphate" J. Biol. Chem., 262(32), 15472-15475.

Himes, R. H., Burton, P. R., y Gallo, J. M. (1977) "Dimethylsulfoxide-induced self-assembly of tubulin lacking associated proteins." J. Biol. Chem., 252, 6222-6228.

Hirose, K., Lockhart, A., Cross, R. A., y Amos, L. A. (1995) "Nucleotide-dependent angular change in kinesin motor domain bound to tubulin." Nature, 376, 277-279.

Holbrook, S. R., Muskal, S. M., y Kim, S. H. (1990) "Predicting surface exposure of amino acids from protein sequence." Protein Eng., 3, 659-665.

Holzbaumer, E. L. F., y Johnson, K. A. (1989) "ADP release is rate limiting in steady-state turnover by the dynein adenosinetriphosphatase." Biochemistry, 28, 5577-5585.

Howard, W. D., y Timasheff, S. N. (1988) "Linkages between the effects of taxol, colchicine, and GTP on tubulin polymerization." J. Biol. Chem., 263(3), 1342-1346.

Hoyle, H. D., y Raff, E. C. (1990) "Two *Drosophila* beta tubulin isoforms are not functionally equivalent." J. Cell Biol., 111, 1009-1026.

Hoyt, M. A. (1994) "Cellular roles of kinesin and related proteins." Curr. Opin. Cell Biol., 6(1), 63-68.

Hubbard, S. J., Campbell, S. F., y Thornton, J. M. (1991) "Molecular recognition. Conformational analysis of limited proteolytic sites and serine proteinase protein inhibitors." J. Mol. Biol., 220, 507-530.

Hwang, Y. W., y Miller, D. L. (1987) "A mutation that alters the nucleotide specificity of

- elongation factor Tu, a GTP regulatory protein." J. Biol. Chem., 262, 13081-13085.
- Inoue, S., y Sato, H. (1967) "Cell motility by labile association of molecules: The nature of mitotic spindle fibres and their role in chromosome movement." J. Gen. Physiol., 50, 259-292.
- Jacobson, G. R., y Rosenbusch, J. P. (1976) "ATP binding to a protease-resistant core of actin" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73(8), 2742-2746.
- Jarayam, B., y Haley, B. (1994) "Identification of peptides within the base binding domains of the GTP- and ATP-specific binding sites of tubulin." J. Biol. Chem., 269(5), 3233-3242.
- Joshi, H. C. (1993) "Gamma-tubulin: the hub of cellular microtubule assemblies" BioEssays, 15(10), 637-643.
- Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., y Pai, E. F. (1990) "Atomic structure of the actin:DAase I complex" Nature, 347, 37-44.
- Kabsch, W., y Sander, C. (1983) "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features." Biopolymers, 22, 2577-2637.
- Kagan, A., y Glick, S. N. (1979). In *Methods of Hormone Radioimmunoassay* (pp. 327-339). New York: Academic Press.
- Kamimura, S., y Mandelkow, E. (1992) "Tubulin protofilaments and kinesin-dependent motility" The Journal of cell biology, 118(4), 865-875.
- Kikkawa, M., Ishikawa, T., Nakata, T., Wakabayashi, T., y Hirokawa, N. (1994) "Direct visualization of the microtubule lattice seam both *in vitro* and *in vivo*." J. Cell Biol., 127(6), 1965-1971.
- Kikkawa, M., Ishikawa, T., Wakabayashi, T., y Hirokawa, N. (1995) "Three-dimensional structure of the kinesin head-microtubule complex." Nature, 376, 274-277.
- Kim, H., Ponstingl, H., y Haley, B. E. (1987) "Identification of the guanosine interacting peptide of the GTP binding site of β -tubulin using 8N₃GTP." Fed. Proc., 46, 2229.
- Kirchner, K., y Mandelkow, E. M. (1985) "Tubulin domains responsible for assembly of dimers and protofilaments" EMBO Journal, 4(9), 2397-2402.
- Kjeldgaard, M., Nissen, P., Thirup, S., y Nyborg, J. (1993) "The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation." Structure, 1(1), 35-50.
- Kraus, E., Little, M., Kempf, T., Hofer-Warbinek, R., Ade, W., y Ponstingl, H. (1981) "Complete amino acid sequence of β -tubulin from porcine brain" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(7), 4156-4160.
- Kreis, T. E. (1987) EMBO J., 6, 2597-2602.
- Kumar, N., y Flavin, M. (1981) "Preferential action of a brain dephosphorylating carboxypeptidase on polymerized tubulin." J. Biol. Chem., 256, 7678-7686.

- L'Hernault, S. W., y Rosenbaum, J. L. (1983) "*Chlamydomonas* α -tubulin is post-translationally modified in the flagella during flagellar assembly." J. Cell Biol., 97, 258-269.
- L'Hernault, S. W., y Rosenbaum, J. L. (1985) "Reversal of the posttranslational modification on *Chlamydomonas* flagellar α -tubulin occurs during flagellar resorption." J. Cell Biol., 100, 457-462.
- la Cour, T. F. M., Nyborg, J., Thirup, S., y Clark, B. F. C. (1985) "Structural details of the binding of guanosine diphosphate to elongation factor Tu from *E. coli* as studied by X-ray crystallography." EMBO J., 4(9), 2385-2388.
- Laemmli, U. K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature, 225, 680-685.
- Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M., y Pellelier, S. L. (1993). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In S. E. Harding, A. J. Rowe, y J. C. Horton (Eds.), *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science* (pp. 90-125) Royal Society of Chemistry.
- Leberman, R., y Egner, U. (1984) "Homologies in the primary structure of GTP-binding proteins: the nucleotide-binding site of EF-Tu and p21." EMBO J., 3(2), 339-341.
- LeDizet, M., y Piperno, G. (1986) "Cytoplasmic microtubules containing acetylated α -tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*: spatial arrangement and properties." J. Cell Biol., 103, 13-22.
- LeDizet, M., y Piperno, G. (1987) "Identification of an acetylation site of *Chlamydomonas* α -tubulin." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 5720-5724.
- LeDizet, M., y Piperno, G. (1991) "Detection of acetylated α -tubulin by specific antibodies." Methods Enzymol., 196, 264-274.
- Lee, B. K., y Richards, F. M. (1971) "The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility" J. Mol. Biol., 55, 379-400.
- Lee, J. C., Corfman, D., Frigon, R. P., y Timasheff, S. N. (1978) "Conformational study of calf brain tubulin." Arch. Biochem. Biophys., 185, 4-14.
- Lee, J. C., Frigon, R. P., y Timasheff, S. N. (1973) "The chemical characterization of calf brain microtubule protein subunits." J. Biol. Chem., 248, 7253-7262.
- Lee, J. C., y Timasheff, S. N. (1974) "Partial specific volumes and interactions with solvent components of proteins in guanidine hydrochloride." Biochemistry, 13, 257-265.
- Lee, J. C., y Timasheff, S. N. (1975) "The reconstitution of microtubules from purified calf brain tubulin." Biochemistry, 14, 5183-5187.
- Lee, J. C., y Timasheff, S. N. (1977) "In vitro reconstitution of calf brain microtubules: effects of solution variables" Biochemistry, 16(8), 1754-1764.

- Lewis, S. A., Lee, M. G. S., y Cowan, N. J. (1985) "Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development" J. Cell Biol., 101, 852-861.
- Lewis, S. A., Wang, D., y Cowan, N. J. (1988) "Microtubule associated protein MAP-2 shares a microtubule binding motif with tau." Science, 242, 936-939.
- Linse, K., y Mandelkow, E. M. (1988) "The GTP-binding peptide of β -tubulin" J. Biol. Chem., 263(29), 15205-15210.
- Littauer, U. Z., Givon, D., Thierauf, M., Ginzburg, I., y Ponstingl, H. (1986) "Common and distinct tubulin binding sites for microtubule associated proteins." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 7162-7166.
- Little, M., y Ludueña, R. F. (1985) "Structural differences between brain β 1- and β 2-tubulins: implications for microtubule assembly and colchicine binding" EMBO J., 4(1), 51-56.
- Little, M., y Ludueña, R. F. (1987) "Location of two cysteines in brain β 1-tubulin that can be cross-linked after removal of exchangeable GTP" B.B.A., 912(1), 28-33.
- Little, M., y Seehaus, T. (1988) "Comparative analysis of tubulin sequences" Comp. Biochem. Physiol., 90B(4), 655-670.
- Liu, F. T., Zinnecker, M., Hamaoka, T., y Katz, D. H. (1979) "New procedures for preparation and isolation of conjugates of proteins and a synthetic copolymer of D-amino acids and immunochemical characterization of such conjugates." Biochemistry, 18(4), 690-697.
- Lobert, S., y Correia, J. J. (1991) "Studies of crystallization for native and subtilisin-cleaved pig brain tubulin." Arch. Biochem. Biophys., 290, 93-102.
- Lobert, S., y Correia, J. J. (1992) "Subtilisin cleavage of tubulin heterodimers and polymers" Archives of Biochemistry and Biophysics, 296(1), 152-160.
- Lobert, S., Hennington, B. S., y Correia, J. J. (1993) "Multiple sites for subtilisin cleavage of tubulin: effects of divalent cations" Cell Motility and the Cytoskeleton, 25, 282-297.
- Lopata, M. A., y Cleveland, D. W. (1987) "In vivo microtubules are copolymers of available beta-tubulin isotypes: localization of each of six vertebrate beta-tubulin isotypes using polyclonal antibodies elicited by synthetic peptides antigens." J. Cell Biol., 105, 1707-1720.
- Lorenz, M., Popp, D., y Holmes, K. C. (1993) "Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm" J. Mol. Biol., 234, 826-836.
- Ludueña, R. F., Banerjee, A., y Khan, I. A. (1992) "Tubulin structure and biochemistry" Curr. Op. Cell Biol., 4, 53-57.
- Lutkenhaus, J. (1993) "FtsZ ring in bacterial cytokinesis" Molecular Microbiology, 9(3), 403-409.
- Maccioni, R. B., Rivas, C. I., y Vera, J. C. (1988) "Differential interaction of synthetic peptides from the carboxyl-terminal regulatory domain of tubulin with microtubule associated proteins."

EMBO J., 7, 1957-1963.

Mandelkow, E., Thomas, J., y Cohen, C. (1977) "Microtubule structure at low resolution by x-ray diffraction" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74(8), 3370-3374.

Mandelkow, E. M., Hermann, M., y Rühl, U. (1985) "Tubulin domains probed by limited proteolysis and subunit-specific antibodies" J. Mol. Biol., 185, 311-327.

Margolin, W., Corbo, J. C., y Long, S. R. (1991) "Cloning and characterization of a *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* cell division gene *ftsZ*." J. Bacteriol., 173, 5822-5830.

Martin, M. T., y Shapiro, R. (1988) "Atomic absorption spectrometry of magnesium" Meth. Enzy., 158, 365-370.

Matsudaira, P. (1987) "Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes." J. Biol. Chem., 262(21), 10035-10038.

Matten, W. T., Aubry, M., West, J., y Maness, P. F. (1990) "Tubulin is phosphorylated at tyrosin by pp60c-src in nerve growth cone membranes." J. Cell Biol., 111, 1959-1970.

May, G. S. (1989) "The highly divergent β -tubulin of *Aspergillus nidulans* are functionally interchangeable." J. Cell Biol., 109, 2267-2274.

Melki, R., y Carrier, M. F. (1993) "Thermodynamics of tubulin polymerization into zinc sheets: assembly is not regulated by GTP hydrolysis" Biochemistry, 32(13), 3405-3413.

Melki, R., Kerjan, P., Waller, J. P., Carrier, M. F., y Pantaloni, D. (1991) "Interaction of microtubule-associated proteins with microtubules: yeast lysyl- and valyl-tRNA synthetases and α 218-235 synthetic peptide as model systems" Biochemistry, 30, 11536-11545.

Mitchinson, T. J., y Sawin, K. E. (1990) "Tubulin flux in the mitotic spindle: where does it come from, where is it going." Cell Motil. Cytoskel., 16, 93-98.

Monteiro, M. J., y Cleveland, D. W. (1988) "Sequence of chicken α 7 tubulin. Analysis of a complete set of vertebrate β -tubulin isotypes" J. Mol. Biol., 199, 439-446.

Mukherjee, A., Dai, K., y Lutkenhaus, J. (1993) "*Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(3), 1053-1057.

Mukherjee, A., y Lutkenhaus, J. (1994) "Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments" J. Bacteriol., 176(9), 2754-2758.

Murphy, D. B., y Borisy, G. G. (1975) "Association of high molecular weight proteins with microtubules and their role in microtubule assembly *in vitro*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 2696-2700.

Murphy, D. B., Wallis, K. T., Machlin, P. S., Ratlie, H., y Cleveland, D. W. (1987) "The sequence and expression of the divergent beta-tubulin in chicken erythrocytes." J. Biol. Chem., 262(29), 14305-14312.

- Nath, J. P., Eagle, G. R., y Himes, R. H. (1985) "Direct photoaffinity labeling of tubulin with guanosine 5'-triphosphate." Biochemistry, 24, 1555-1560.
- Nogales, E., Wolf, S. G., Khan, I. A., Ludueña, R. F., y Downing, K. H. (1995) "Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site." Nature, 375, 424-427.
- Oosawa, F., y Asakura, S. (1975). *Thermodynamics of the polymerization of protein*. London: Academic Press Inc. LTD.
- Paschal, B. M., Obar, R. A., y Vallee, R. B. (1989) "Interaction of brain cytoplasmic dynein and MAP2 with a common sequence at the C terminus of tubulin" Nature, 342, 569-572.
- Paschal, B. M., y Vallee, R. B. (1987) "Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C." Nature, 330, 181-183.
- Paturle, L., Eddé, B., Denoulet, P., Dorsselaer, A. V., Mazarguil, H., Le Caer, J. P., Wehland, J., y Job, D. (1991) "Characterization of a major brain tubulin which cannot be tyrosinated." Biochemistry, 30, 10523-10528.
- Paturle, L., Wehland, J., Margolis, R. L., y Job, D. (1989) "Complete separation of tyrosinated, detyrosinated and nontyrosinatable brain tubulin subpopulations using affinity chromatography." Biochemistry, 28(6), 2698-2704.
- Piperno, G., LeDizet, M., y Chang, X. J. (1987) J. Cell Biol., 104, 289-302.
- Plyte, S. E., y Kneale, G. G. (1994) "Limited proteolysis of protein-nucleic acid complexes." Methods Mol. Biol., 30, 161-168.
- Ponstingl, H., Krauhs, E., Little, M., y Kempf, T. (1981) "Complete amino acid sequence of α -tubulin from porcine brain" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(5), 2757-2761.
- Pratt, L. F., y Cleveland, D. W. (1988) "A survey of the α -tubulin gene family in chicken: unexpected sequence heterogeneity in the polypeptides encoded by five expressed genes" EMBO J., 7(4), 931-940.
- Pratt, L. F., Okamura, S., y Cleveland, D. W. (1987) "A divergent testis-specific α -tubulin isotype that does not contain a coded C-terminal tyrosine" Mol. Cell. Biol., 7(1), 552-555.
- RayChaudhuri, D., y Park, J. T. (1992) "Escherichia coli cell-division gene ftsZ encodes a novel GTP-binding protein." Nature, 359(6392), 251-254.
- RayChaudhuri, D., y Park, J. T. (1994) "A point mutation converts Escherichia coli FtsZ septation GTPase to an ATPase." J. Biol. Chem., 269(37), 22941-22944.
- Redeker, V., Le Caer, J. P., Rossier, J., y Promé, J. C. (1991) "Structure of the polyglutamyl side chain posttranslationally added to α -tubulin" J. Biol. Chem., 266(34), 23461-23466.
- Redeker, V., Levilliers, N., Schmitter, J. M., Le Caer, J. P., Rossier, J., Adoutte, A., y Bré, M. H. (1994) "Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules." Science, 266, 1688-1691.

- Redeker, V., Melki, R., Promé, D., Le Caer, J. P., y Rossier, J. (1992) "Structure of tubulin c-terminal domain obtained by subtilisin treatment. The major alpha and beta tubulin isotypes from pig brain are glutamylated." *FEBS Lett.* 313(2), 185-192.
- Reed, J., Hull, W. E., Ponstingl, H., y Himes, R. H. (1992) "Conformational properties of the α (400-436) β (400-445) C-terminal peptides of porcine brain tubulin" *Biochemistry*, 31, 11888-11895.
- Rost, B., y Sander, C. (1993) "Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy" *J. Mol. Biol.* 232, 584-599.
- Rost, B., y Sander, C. (1994a) "Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure" *Proteins*, 19(1), 55-72.
- Rost, B., y Sander, C. (1994b) "Conservation and prediction of solvent accessibility in protein families." *Proteins: Struct. Func. Gen.*, 20, 216-226.
- Rost, B., Sander, C., y Schneider, R. (1994) "Redefining the goals of protein secondary structure prediction" *J. Mol. Biol.* 235, 13-26.
- Rüdiger, M., Plessman, U., Klöppel, K. D., Wehland, J., y Weber, K. (1992) "Class II tubulin, the major brain β tubulin isotype is polyglutamylated on glutamic acid residue 435" *FEBS Lett.* 308(1), 101-105.
- Russell, R. B., y Barton, G. J. (1993) "The limits of protein secondary structure prediction accuracy from multiple sequence alignment" *J. Mol. Biol.* 234, 951-957.
- Sackell, D. L., y Wolff, J. (1986) "Proteolysis of tubulin and the substructure of the tubulin dimer" *J. Biol. Chem.* 261(19), 9070-9076.
- Sage, C. R., Davis, A. S., Dougherty, C., Sullivan, K., y Farrell, K. W. (1991) "Phenotypical and biochemical characterization of a mutant site-directed to a putative GTP binding/hydrolysis domain of β -tubulin in the budding yeast *S. cerevisiae*." *J. Cell Biol.* 115, 36a.
- Sage, C. R., Dougherty, C. A., Davis, A. S., Burns, R. G., Wilson, L., y Farrell, K. W. (1995) "Site-directed mutagenesis of putative GTP-binding sites of yeast β -tubulin: evidence that α -, β -, and τ -tubulin are atypical GTPases." *Biochemistry*, 34, 7409-7419.
- Sander, C., y Schneider, R. (1991) "Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment" *Proteins*, 9, 56-68.
- Sanghamitra, R., Wolf, S. G., Howard, J., y Downing, K. H. (1995) "Kinesin does not support the motility of Zinc-microtubules." *Cell Motil. Cytoskeleton*, 30(2), 146-152.
- Schachman, H. K. (1959). *Ultracentrifugation in Biochemistry*. New York: Academic Press.
- Schiff, P. B., y Horowitz, S. B. (1981) "Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule associated proteins." *Biochemistry*, 20, 3247-3252.

- Schliwa, M. (1986). *The Cytoskeleton*. New York: Springer-Verlag.
- Schulz, G. E. (1992) "Binding of nucleotides by proteins." Curr. Opin. Struct. Biol., 2, 61-67.
- Serrano, L., Avila, J., y Maccioni, R. B. (1984) "Controlled proteolysis of tubulin by subtilisin: Localization of the site for MAP2 interaction" Biochemistry, 23, 4675-4681.
- Serrano, L., Diaz Nido, J., Wandosell, F., y Avila, J. (1987) "Tubulin phosphorylation by casein kinase II is similar to that found *in vivo*." J. Cell Biol., 105, 1731-1739.
- Serrano, L., Dominguez, J. E., y Avila, J. (1988) "Identification of zinc-binding sites of proteins: zinc binds to the amino-terminal region of tubulin." Anal. Biochem., 172, 210-218.
- Serrano, L., Valencia, A., Caballero, R., y Avila, J. (1986) "Localization of the high affinity calcium-binding site on tubulin molecule." J. Biol. Chem., 261, 7076-7081.
- Shearwin, K. E., y Timasheff, S. N. (1992) Biochemistry, 31, 8080-8089.
- Shivanna, B. D., Mejillanos, M. R., Williams, T. D., y Himes, R. H. (1993) "Exchangeable GTP binding site of β -tubulin" J. Biol. Chem., 268(1), 127-132.
- Sigal, I. S., Gibbs, J. B., D'Alonzo, J. S., Temeles, G. L., Wolanski, B. S., Socher, S. H., y Scolnick, E. M. (1986) "Mutant *ras*-encoded proteins with altered nucleotide binding exert dominant biological effects" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 952-956.
- Sigel, H. (1977) J. Inorg. Nucl. Chem., 39, 1903-1911.
- Sloboda, R. D., Rudolph, S. A., Rosenbaum, J. L., y Greengard, P. (1975) "Cyclic AMP-dependent endogenous phosphorylation of a microtubule-associated protein." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 177-181.
- Song, Y. H., y Mandelkow, E. (1993) "Recombinant kinesin motor domain binds to beta-tubulin and decorates microtubules in a B surface lattice." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 765-768.
- Sternlicht, H., Yaffe, M. B., y Farr, G. W. (1987) "A model of the nucleotide-binding site in tubulin" FEBS Lett. 214(2), 226-235.
- Sullivan, K. F. (1988) "Structure and utilization of tubulin isotypes" Ann. Rev. Cell Biol., 4, 687-716.
- Sullivan, K. F., y Cleveland, D. W. (1984) "Sequence of a highly divergent β -tubulin gene reveals regional heterogeneity in the β -tubulin polypeptide." J. Cell Biol., 99, 1754-1760.
- Sullivan, K. F., y Cleveland, D. W. (1986) "Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate β tubulin polypeptide classes" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4327-4331.
- Sullivan, K. F., Lau, J. T., y Cleveland, D. W. (1985) "Apparent gene conversion between β -tubulin genes yield multiple regulatory pathways for a single β -tubulin polypeptide isotype."

Mol. Cell Biol., 5, 2454-2465

Sullivan, K. F., Machlin, P. S., Ratria, H., y Cleveland, D. W. (1986) "Sequence and expression of the chicken β 3-tubulin gene. A vertebrate testis β -tubulin isotype." J. Biol. Chem., 261, 13317-13322

Tanford, C. (1963). *Physical chemistry of macromolecules*. New York: Wiley.

Theodorakis, N. G., y Cleveland, D. W. (1992) "Physical evidence for cotranslational regulation of β -tubulin mRNA degradation." Mol. Cell Biol., 12, 791-799.

Tilney, L. G., Brian, J., Bush, D. J., Fujiwara, K., Mooseker, M. S., Murphy, D. B., y Snyder, D. H. (1973) "Microtubules: evidence for 13 protofilaments." J. Cell Biol., 59, 267-275.

Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A., y Sander, C. (1991) "The *ras* protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids." Biochemistry, 30(19), 4637-4648.

Valenzuela, P., Quiroga, M., Zaldivar, J., Rutter, W. J., Kirschner, M. W., y Cleveland, D. W. (1981) "Nucleotide and corresponding amino acid sequence encoded by α and β tubulin mRNAs." Nature, 289, 650-655.

Vallee, R. B. (1990) "Molecular characterization of high molecular weight microtubule-associated proteins: some answers, many questions" Cell Motil. and the Cytosk., 15, 204-209.

Vallee, R. B., y Shpetner, H. S. (1990) "Motor proteins of cytoplasmic microtubules." Ann. Rev. Biochem., 59, 909-932.

van Holde, K. E. (1985). *Physical biochemistry*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

Villasante, A., Wang, D., Dobner, P., Dolph, P., Lewis, S. A., y Cowan, N. J. (1986) "Six mouse α -tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: testis-specific expression of two sister genes" Mol. Cell Biol., 6(7), 2409-2419.

Voskuil, J. L. A., Westerboek, C. A. M., Wu, C., Kolk, A. H. J., y Nanninga, N. (1994) "Epitope mapping of *Escherichia coli* cell division protein FtsZ with monoclonal antibodies" J. Bacteriol., 176(7), 1886-1893.

Wako, H., y Blundell, T. L. (1994) "Use of amino acid environment-dependent substitution tables and conformational propensities in structure prediction from aligned sequences of homologous proteins I. Solvent accessibility classes" J. Mol. Biol., 238, 682-692.

Wandosell, F., Serrano, L., Hernandez, M. A., y Avila, J. (1986) "Phosphorylation of tubulin by calmodulin-dependent protein kinase." J. Biol. Chem., 261, 10332-10339.

Wang, D., Villasante, A., Lewis, S. A., y Cowan, N. J. (1986) "The mammalian β -tubulin repertoire: hematopoietic expression of a novel, heterologous β -tubulin isotype" J. Cell Biol., 103, 1903-1910.

Wang, X., y Lutkenhaus, J. (1993) "The FtsZ protein of *Bacillus subtilis* is localized at the

- division site and has GTPase activity that is dependent upon FtsZ concentration." Mol. Microbiol., 9(3), 435-442.
- Wehland, J., y Weber, K. (1987) "Tubulin-tyrosine ligase has a binding site on β -tubulin: a two domain structure of the enzyme." J. Cell Biol., 104, 1059-1067.
- Weisenberg, R. C., Borisy, G. G., y Taylor, E. (1968) "The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules." Biochemistry, 7, 4466-4479.
- Wilson, J. E. (1991) "The use of monoclonal antibodies and limited proteolysis in elucidation of structure-function relationships in proteins." Methods of Biochemical Analysis, 35, 207-250.
- Wolf, S. G., Mosser, G., y Downing, K. H. (1993) "Tubulin conformation in Zinc-induced sheets and macro-tubules" J. Structural Biology, 111, 190-199.
- Wolff, A., de Néchaud, B., Chillet, D., Mazarguil, H., Desbruyères, E., Audebert, S., Eddé, B., Gros, F., y Denoulet, P. (1992) "Distribution of glutamylated α and β -tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335" Eur. J. Cell Biol., 59, 425-432.
- Woods, A., Sherwin, T., Sasie, R., MacRae, T. H., Baines, A. J., y Gull, K. (1989) "Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies." J. Cell Sci., 93(3), 491-500.
- Yen, T. J., Machlin, P. S., y Cleveland, D. W. (1988) "Autoregulated instability of β -tubulin mRNAs by recognition of the nascent amino terminus of β -tubulin." Nature, 334, 580-585.
- Yi, Q. M., y Lutkenhaus, J. (1985) "The nucleotide sequence of the essential cell-division gene *ftsZ* of *Escherichia coli*." Gene, 36, 241-247.
- Zhou, R. P., Oskarsson, M., Paules, R. S., Schulz, N., Cleveland, D. W., y Vande-Woude, G. F. (1991) "Ability of the c-mos product to associate with and phosphorylate tubulin" Science, 251, 671-675.